

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana Anita MATIĆ

**KONTAMINACIJA ŽIVIL Z BAKTERIJAMI VRSTE**  
*Staphylococcus aureus*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana Anita MATIĆ

**KONTAMINACIJA ŽIVIL Z BAKTERIJAMI VRSTE**  
*Staphylococcus aureus*

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**FOOD CONTAMINATION WITH BACTERIA**  
*Staphylococcus aureus*

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Presednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Anita Matić

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579.67.08 + 579.24:614.31(043)=163.6  
KG živila/kontaminacija živil/patogeni mikroorganizmi/*Staphylococcus epidermidis*/*Staphylococcus aureus*/izolacija bakterij/identifikacija bakterij/enterotoksini  
AV MATIČ, Ana Anita  
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)  
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN KONTAMINACIJA ŽIVIL Z BAKTERIJAMI VRSTE *Staphylococcus aureus*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP VIII, 53 str., 17 pregl., 4 sl.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) so eden glavnih povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano. Zato je pomembno, da imamo na voljo zanesljive metode izolacije in identifikacije, saj lahko s tem zagotovimo podatke za nadaljno kontrolo živil. Namen naše naloge je bil izolirati bakterije vrste *Staphylococcus aureus* s klasičnimi metodami izolacije in identifikacije iz različnih vzorcev živil in oceniti njihovo higiensko stanje. Za izolacijo in določitev skupnega števila koagulaza pozitivnih stafilokokov smo uporabili gojišče Baird – Parker. Za njihovo identifikacijo smo uporabili barvanje po Gramu, hemolizo, izkoriščanje različnih sladkorjev in manitola, izkoriščanje vira dušika, rast v anaerobnih pogojih in pri različnih temperaturah ter koagulazni, DNA-azni in katalazni test. Skupno število koagulaza pozitivnih stafilokokov je bilo med  $1 \times 10^2$  do  $6,86 \times 10^5$  cfu/g, kar še ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi, saj pride do tvorbe toksina šele pri  $10^6$  cfu/g. Rezultati analiz so tudi pokazali, da sta v analiziranih živilih najbolj zastopani vrsti *S. aureus* in *Staphylococcus epidermidis*. Bakterije vrste *S. aureus* so bile najdene predvsem v vzorcih govejih jeter in pljuč (100 %), piščančjih krilih in razdetem mesu (40 %) ter svinjskih jetrih in piščančjem fileju (25 %), bakterije vrste *S. epidermidis* pa smo našli v vzorcih govejih jeter, razdetega mesa, piščančjih bedrih, kremni rezini in sezamovi štručki s tuninim namazom.

## KEY WORD DOCUMENTATION

- ŠD Dn
- DC UDC 579.67.08 + 579.24:614.31(043)=163.6
- DX foods/food contamination/pathogens/*Saphylococcus epidermidis*/  
*Staphylococcus aureus*/isolation of bacteria/identification of bacteria/enterotoxins
- AU MATIĆ, Ana Anita
- AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
- PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Tehnology
- PY 2010
- TI FOOD CONTAMINATION WITH BACTERIA *Staphylococcus aureus*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO VIII, 53 p., 17 tab., 4 fig.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Staphylococcus aureus* is one of the most important food – borne pathogens, that`s why it is very important that we have reliable methods of isolation and classification so that we could assure further food control. For the purpose of this research we used classical methods of isolation and identification and we have evaluated their hygienic state. For classification and enumeration we have used Baird – Parker. For their isolation we have used Gram staining, hemolysis, utilization of different sugars and manitol, sources of nitrogen, growth in anaerobic conditions and growth at different temperature as well test on coagulase, DNase and catalase. Numbers for coagulase – positive staphylococci were beetwen  $1 \times 10^2$  to  $6.86 \times 10^5$  cfu/g, which does not represent danger for human health, as the number of bacteria by which enterotoxins can be produce, stands by  $10^6$  cfu/g. Results of analysis have shown that *S. aureus* and *S. epidermidis* are common bacteria in analized food. *S. aureus* was found mostly in bovine liver and lungs (100 %) samples, chicken wing and minced meat (40 %) samples and pork liver and chicken filet (25 %) and in *S. epidermidis* in sampels of bovine liver, minced meat, cream cake and sandwich with tuna`s spread.

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Staphylococcus</i>	3
<b>2.1.1 Morfološke in fiziološke lastnosti stafilokokov</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Vrste bakterij v rodu <i>Staphylococcus</i></b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>4</b>
2.2 BOLEZNI, POVZROČENE S STAFILOKOKI	4
<b>2.2.1 Proti meticilinu odporne bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Stafilokokni enterotoksini</b>	<b>5</b>
2.3 KONTAMINACIJA ŽIVIL Z BAKTERIJAMI VRSTE <i>S. aureus</i>	6
<b>2.3.1 Pogostnost kontaminacije živil z bakterijami vrste <i>S. aureus</i></b>	<b>6</b>
2.4 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE <i>S. aureus</i>	8
<b>3 MATERIALI IN METODE DE LA</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIALI	11
<b>3.1.1 Vzorci živil</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2 Reagenti</b>	<b>11</b>
<b>3.1.3 Gojišča</b>	<b>12</b>
<b>3.1.4 Laboratorijska oprema</b>	<b>13</b>
3.2 METODE	14
<b>3.2.1 Potek eksperimentalnega dela</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2 Izolacija koagulaza pozitivnih stafilokokov</b>	<b>15</b>
<b>3.2.3 Identifikacija bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>17</b>
3.2.3.1 Barvanje po Gramu	17
3.2.3.2 Katalazni test	17

3.2.3.3 Izkoriščanje glukoze in drugih sladkorjev (maltoza, saharoza, riboza, galaktoza, laktoza)	17
3.2.3.4 Izkoriščanje manitola	18
3.2.3.5 DNA-zni test	18
3.2.3.6 Koagulazni test	18
3.2.3.7 Hemoliza	18
3.2.3.8 Rast bakterij pri različnih temperaturah (15 °C in 45 °C)	18
3.2.3.9 Rast bakterij v gojišču s 15 % NaCl	18
3.2.3.10 Rast bakterij v anaerobnih razmerah	18
<b>4 REZULTATI</b>	<b>19</b>
4.1 ŠTEVILO KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKOV V ŽIVILIH	19
4.2 REZULTATI OSNOVNIH TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ VRSTE <i>S. aureus</i>	21
4.3 REZULTATI DODATNIH TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ VRSTE <i>S. aureus</i>	37
4.4 ANALIZA REZULTATOV	46
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>48</b>
5.1 POGOSTOST IZOLACIJE BAKTERIJ RODU <i>Staphylococcus</i> IZ ŽIVIL	48
5.2 METODOLOŠKI POMEN	49
5.3 SKLEPI	49
<b>6 POVZETEK</b>	<b>50</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>51</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Skupno število stafilokokov v različnih vzorcih živil	19
Preglednica 2: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev razdetega mešanega mesa z osnovnimi testi	21
Preglednica 3: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev svinjskih jeter z osnovnimi testi	24
Preglednica 4: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih kril z osnovnimi testi	26
Preglednica 5: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev govejih pljuč in jeter z osnovnim testi	29
Preglednica 6: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih jeter, piščančjih beder, piščančjega fileja ter piščančjih jeter in srca z osnovnimi testi	30
Preglednica 7: Identifikacija bakterij koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev sendvičev z osnovnimi testi	32
Preglednica 8 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev slaščic z osnovnimi testi	35
Preglednica 9: Identifikacija koagulata pozitivnih stafilokokov iz vzorcev razdetega mesa	37
Preglednica 10 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev svinjskih jeter z dodatnimi testi	39
Preglednica 11: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih kril z dodatnimi testi	40
Preglednica 12 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev govejih pljuč in jeter z dodatnim testi	41
Preglednica 13 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih beder, fileja, jeter in srca z dodatnimi testi	42
Preglednica 14 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev sendvičev z dodatnimi testi	43
Preglednica 15 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev slaščic z dodatnimi testi	45
Preglednica 16 : Število in deleži izoliranih bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i> v različnih vzorcih živil	46
Preglednica 17 : Število vzorcev živil v katerih smo bakterije vrste <i>S. aureus</i> določili direktno z izolacijo in število vzorcev, v katerih smo bakterije vrste <i>S. aureus</i> določili po obogatitvi vzorca	47



## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela	14
Slika 2: Izolacija in identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov direktno iz živila	15
Slika 3: Izolacija in identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov po obogatitvi v slanem bujonu	16
Slika 4: Deleži [v odstotkih] različnih skupin živil, v katerih smo določili bakterije vrste <i>S. aureus</i>	47

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

OKRAJŠAVA, SIMBOL	POMEN
FDA	Organizacija za hrano in zdravila (U.S. Food and Drug Administration)
MRSA	Proti meticilinu odporne bakterije vrste <i>S. aureus</i> (Methicilin resistant <i>S. aureus</i> )
RPFA	Agar z zajčjo krvno plazmo (Rabbit plasma fibrinogen agar)
BP cfu	Gojišče Baird-Parker Kolonijska enota

## 1 UVOD

Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* so eden od pomembnejših povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano. Živila se z bakterijami vrste *S. aureus* lahko kontaminirajo neposredno iz živali ali pa je kontaminacija rezultat slabe higiene med proizvodnim procesom, skladiščenjem ali prodajo, saj so tudi ljudje lahko prenašalci teh bakterij. Število bakterij vrste *S. aureus* s protimikrobno odpornostjo narašča in povzroča težko ozdravljive okužbe, hkrati pa narašča tudi povečanje tveganja za prenos te odpornosti na človeško mikrofloro preko hrane (Normanno in sod., 2007a).

V zadnjem desetletju so bile po vsem svetu bolezni povzročene z stafilokoki prijavljene kot tretja najpogostejša bolezen, ki se prenaša z hrano (Normanno in sod., 2007a). Samo v Ameriki je letno število prijavljenih primerov stafilokoknih zastrupitev s hrano okoli 185.000 (od tega je 1750 primerov hospitalizacij) (Normanno in sod., 2007a). Evropska agencija za varnost hrane (2010) navaja, da je bilo v Evropi leta 2008 kar 291 izbruhov bolezni povzročenih z zastrupitvijo s hrano, ki je bila okužena z bakterijami iz rodu *Staphylococcus*. To predstavlja 5,5 % od skupnega števila vseh prijavljenih izbruhov bolezni v Evropski Uniji v letu 2008. Ravno tako Evropska agencija za varnost hrane (2008) navaja, da je bil v Sloveniji zabeležen 1 izbruh bolezni, ki ga je povzročila zastrupitev s stafilokoknim enterotoksinom C. Vendar pa je stafilokokna zastrupitev s hrano podcenjena. To je blaga zastrupitev, ki jo povzroči zaužitje živila, katero vsebuje od 20 ng do 1 $\mu$ g enterotoksina. Znaki (slabost, trebušni krči, diareja in bruhanje) te zastrupitve se pojavijo v nekaj urah (1 – 6 h), po zaužitju kontaminirane hrane, odvisno od dovzetnosti in zaužite količine toksina. Klinični znaki te bolezni izginejo v 24 do 48 urah, smrt pa nastopi le redko (v Ameriki so ocenili, da se v vsakem letu pojavita dva smrtna primera). Kljub temu, da se stafilokokna zastrupitev z živili pojavlja v mili obliki, pa predstavlja ta bolezen veliko ekonomsko škodo in socialno breme, saj v Ameriki namenijo kar 1,5 milijarde dolarjev za reševanje teh bolezni (Normanno in sod., 2007a).

Bakterije vrste *S. aureus* proizvajajo veliko število toksinov, ki povzročajo številne bolezni. Stafilokokni enterotoksini pripadajo veliki družini stafilokoknih in streptokoknih pirogenih enterotoksinov s skupno strukturo, funkcijo, sekvenčno homologijo in filogenetskimi povezavami (Balban in Rasooly, 2000). So termostabilni in odporni na gastrointestinalne encime, saj tudi v prebavnem traktu ohranijo svojo biološko aktivnost. Velik pomen imajo v proizvodnji ter pripravi hrane in imajo tako neposreden vpliv na zdravje ljudi, saj jih zaradi njihove termostabilnosti ne moremo uničiti s pasterizacijo (Ertas in sod., 2010), zato je pomembno, da nosilec živilske dejavnosti sledi smernicam dobre higienske prakse (Pollak in sod., 2002). Po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili (2000) so živila zdravstveno ustrežna oziroma varna, če poleg ostalih zahtev ne vsebujejo mikroorganizmov ali parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi.

Čeprav so koagulaza pozitivni stafilokoki glavni povzročitelji zastrupitve z hrano, pa nekatere raziskave čedalje bolj izpostavljajo koagulaza negativne stafilokoke, kot možne povzročitelje zastrupitve z hrano (Al – Tarazi in sod., 2009). Zato je mikrobiološka preiskava hrane pomemben del obvladovanja mikrobiološke varnosti v prehranski verigi.

Veliko laboratorijev uporablja za preiskavo živil klasične gojitvene metode izolacije, kot so selektivna gojišča za izolacijo in kvantifikacijo tarčnega organizma. Te metode so zelo poceni, vendar pa je njihova glavna slabost da so težavne, zahtevajo velike količine tekočega ali trdnega medija in reagentov ter dolgotrajne postopke izolacije in obdelave podatkov (Jasson in sod., 2010).

### 1.1 CILJI NALOGE

Namen našega dela je bil izolirati bakterije vrste *Staphylococcus aureus* iz različnih živil v prometu s klasičnimi mikrobiološkimi metodami izolacije in identifikacije ter oceniti higiensko stanje posameznih skupin živil.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bomo s pomočjo klasične izolacije in identifikacije bakterij vrste *Staphylococcus aureus* iz različnih živil lahko ocenili njihovo higiensko stanje in da število teh bakterij v manjšem deležu kontaminiranih živil ne bo večje od  $10^4$  cfu/ml ali g živila.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJE RODU *Staphylococcus*

#### 2.1.1 Morfološke in fiziološke lastnosti stafilokokov

Bakterije rodu *Staphylococcus* so grampozitivni, negibljivi fakultativno anaerobni koki, ki ne tvorijo spor in bolje rastejo v anaerobnem kot v aerobnem okolju. Odkril jih je škotski kirurg Alexander Ogston leta 1880 (Seme, 2002). Njegova raziskovanja so nadaljevali številni znanstveniki, ki so poskušali na podlagi homologije DNA, imuno-kemijskih in biokemijskih lastnosti določiti različne vrste stafilokokov (Bergdoll in Wong, 1993). Danes je poznanih 36 vrst bakterij rodu *Staphylococcus* (Bergy's Manual..., 1994). Tudi Irlinger (2008) navaja, da je potrjenih 36 vrst bakterij rodu *Staphylococcus*, ki so sestavljene iz sevov, ki so patogeni, saprofitni ali pa se uporabljajo kot starter kulture v živilski industriji. Stafilokoki se ločijo od striktno aerobnih mikrokokov po sestavi celične stene, predvsem pa po njihovi zmožnosti za rast in proizvodnjo kisline iz glukoze v anaerobnih razmerah (Bergdoll in Wong, 1993).

Stafilokoki so ubikvitarni mikroorganizmi. Njihov glavni življenjski prostor so nosna votlina, koža in grlo ljudi ter toplokrvnih živali. Lahko pa jih najdemo tudi v zraku, zemlji, vodi, odpadnih vodah, na površini rastlin, perutnini ter mesnih in mlečnih izdelkih, (Bergdoll in Wong 1993).

#### 2.1.2 Vrste bakterij v rodu *Staphylococcus*

Večina vrst stafilokokov pogosto naseljuje kožo in sluznico ljudi, nekatere vrste (*Staphylococcus capitis*) pa lahko najdemo tudi na lasišču. Poleg že omenjene vrste stafilokokov pa pri ljudeh najdemo tudi vrste *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, in *S. xylosus* (Martin in Iandolo, 1999). Najbolj pogost povzročitelj bolezni med njimi so bakterije vrste *S. epidermidis* (Landolo, 2000). Poleg bakterij vrste *S. epidermidis* so kot povzročitelji infekcij pomembne bakterije vrst *S. haemolyticus* in pa *S. cohnii*, saj povzročajo okužbe ran, nahajajo pa se tudi v sečnem predelu. Bakterije vrste *S. schleiferi* (podvrsta *schleiferi*) so bile najdene v kliničnih vzorcih bolnikov z zmanjšano odpornostjo na okužbe (Jay, 1992).

Bakterije vrste *S. hycus* so našli na koži prašičev (povzročitev lezij), mleku in perutnini. Koža nižjih primatov je pomemben habitat bakterij vrste *S. simulans*. Bakterije vrste *S. schleiferi* (*coagulans*) pa povzročajo vnetje ušes pri psih. Bakterije vrste *S. sciuri* naseljujejo kožo glodavcev, *S. lentus* in *S. caprae* najdemo predvsem na kozah in v kozjem mleku, bakterije vrste *S. dephini* pa so izolirali iz delfinov (Jay, 1992).

Poleg tega, da jih je mogoče najti na koži ljudi in živali pa lahko stafilokoke izoliramo tudi iz različnih živil kot so meso, siri in mleko. Pomembna je tudi njihova tehnološka vrednost, saj sodelujejo pri zorenju fermentiranih izdelkov, predvsem klobas (npr.: *S. saprophyticus* pri oblikovanju arome klobas; *S. xylosus* pri oblikovanju barve in arome ter

pri zorenju klobas (Morot – Bizot in sod., 2003 )) in sirov (*S. equorum*, *S. caprae*, *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. lentus*, *S. sciuri*) (Irlinger, 2008).

### 2.1.3 Bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

Bakterije vrste *S. aureus* so gram pozitivne, lahko rastejo s kisikom ali brez njega (fakultativno anaerobne) in so katalaza-pozitivne ter oksidaza-negativne. Poleg omenjenih encimov bakterije vrste *S. aureus* tvorijo tudi encima koagulazo in termonukleazo (Food Doctors, 2008).

Optimalna temperatura za njihovo rast je med 30 in 37 °C, dobro rastejo tudi ob prisotnosti NaCl (od 7 do 10 % koncentracija, nekateri sevi pa tudi pri 20 % koncentraciji NaCl). Optimalna vrednost pH za rast je med 6 in 7 (Jeršek, 2007).

Na bogatem gojišču tvorijo velike rumene kolonije (Food Doctors, 2008), na gojišču Baird – Parker pa tvorijo bakterije vrste *S. aureus* okrogle, črne, gladke, svetleče, konveksne kolonije, ki merijo v premeru 2–3 mm. Na krvnem agarju običajno tvorijo zlato rumene gladke kolonije, obdane z ozkim pasom popolne hemolize, zato so jih poimenovali zlati stafilokoki (Maršič, 2009).

Glavni življenjski prostor bakterije vrste *S. aureus* je nosna votlina, gnojne rane, vneto grlo, lahko pa jih najdemo tudi na koži, v očeh ali prebavnem traktu. Od tod lahko prehajajo v zrak, prah ali na obleko, od koder se nato lahko prenašajo na živila (Jeršek, 2007).

## 2.2 BOLEZNI, POVZROČENE S STAFILOKOKI

Bakterije vrste *S. aureus* lahko povzročijo veliko okužb in bolezni pri živalih. Pogostnost enterotoksigenih stafilokokov je odvisna od vrste živali. Pri ovcah in kozah, obolelih z mastitisom je bilo kar 60–80 % izoliranih sevov stafilokokov enterotoksigenih, medtem ko so pri kravah, obolelih z mastitisom odkrili, da je manj kot 15 % izoliranih sevov enterotoksigenih (Bergdoll in Wong, 1993).

Pri človeku največkrat zasledimo zastrupitve s hrano, ki jo povzroči zaužitje enterotoksinov, ki jih proizvajajo določeni sevi bakterij vrste *S. aureus*. Značilni znaki za tako vrsto zastrupitve so slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu in diareja. V veliko primerih so se pokazali tudi znaki, kot so dehidracija, glavoboli, krči v mišicah, padec krvnega tlaka in nihanja v telesni temperaturi. Smrt se le redko pojavi pri tej vrsti zastrupitve, čeprav so zabeležili nekaj smrtnih žrtev med starejšo oziroma zelo mlado populacijo (Tranter, 1987).

Odpornost organizma proti stafilokoknim okužbam je zelo slabo poznana. Običajno imajo zdravi ljudje visoko stopnjo odpornosti za invazivne okužbe. Bakterije običajno kolonizirajo sluznice in površino vrhnjice in dokler te ostanejo nepoškodovane, nam predstavljajo glavni vir naravne odpornosti proti okužbam.

Koagulaza negativni stafilokoki običajno naseljujejo kožo ljudi in sluznico membran. Zelo dolgo jih niso upoštevali kot kontaminante, sedaj pa se je pojavila možnost, da so tudi koagulaza negativni stafilokoki patogeni. Okoli 55-75 % bolnišničnih izolatov je odpornih

na meticilin. Pri bolnikih z zmanjšanim imunskim odzivom sta najbolj pogosti bolezni endokarditis in okužbe sečil z bakterijami vrste *Staphylococcus saprophytus*. Koagulaza negativni stafilokoki povzročajo tudi okužbo krvnega obtoka, kar lahko vodi do nastanka sepse (Piette in Verschraegen, 2009). Poleg tega so koagulaza negativni stafilokoki eden glavnih povzročiteljev mastitisa pri kravah. Veliko število koagulaza negativnih stafilokokov je bilo izoliranih iz sesnih kanalov, kože in predelov izven vimen (Taponen in Pyorala, 2009). Zato se med laktacijo veliko uporabljajo antibiotiki za kontrolo bakterij, ki povzročajo mastitis na kmetijah. Pomembno je spremljati dovzetnost koagulaza negativnih stafilokokov na antibiotike, saj se pojavlja odpornost teh bakterij na določena zdravila (Sawant in sod., 2009).

### **2.2.1 Proti meticilinu odporne bakterije vrste *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Proti meticilinu odporne bakterije vrste *Staphylococcus aureus* predstavljajo velik problem za zdravje ljudi. Prvič so bile opisane leta 1961, saj se je takrat meticilin prvič pojavil na tržišču. Razvoj protimikrobne odpornosti tako za človeške kot za živalske patogene je posledica obsežne uporabe protimikrobnih sredstev ali pa rastnih pospeševalcev pri proizvodnji hrane živalskega izvora (Normanno in sod., 2007b).

Bakterije vrste *S. aureus*, ki so odporne proti meticilinu so odporne tudi proti ostalim betalaktamskim antibiotikom. Te bakterije proizvajajo poseben penicilin vezoči protein (ang. penicilin binding protein 2a ali PBP2a), ki ga kodira kromosomski gen *mec A* (Maršič, 2009).

Možnost prenosa proti meticilinu odpornih bakterij vrste *S. aureus* preko živil na človeka je bila nepoznana vse do leta 1994. Danes pa vemo, da so živila odličen vir za prenos patogenih bakterij na ljudi, predvsem tistih, ki imajo oslabiljen imunski sistem. Poznano je, da kadar bakterije vrste *S. aureus* vstopijo v prebavni trakt zdravega človeka so te uničene z želodčnimi sokovi; pri človeku z oslabiljenim imunskim sistemom pa lahko vstopijo v ožilje in povzročijo nadaljnje okužbe organizma, kar lahko vodi do sepse (Pesavento in sod., 2007).

Za zdravljenje MRSE se v večini primerov uporabljata le glikopeptidna antibiotika vankomicin in teikoplanin (Seme, 2002). Zaradi odpornosti bakterij na številne antibiotike (zasledimo lahko tudi čedalje večjo odpornost na vankomicin) se je pojavila težnja po odkrivanju novih antibiotikov in cepiv (Landolo, 2000).

### **2.2.2 Stafilokokni enterotoksini**

Stafilokokni enterotoksini spadajo v družino pirogernih toksinov stafilokokov in enterokokov. Povzročajo lahko zastrupitve s hrano, sindrome podobne toksičnemu šoku in nekatere alergijske in avtoimunske bolezni (Balaban in Rasooly, 2000).

Do zdaj je bilo opisanih devet glavnih seroloških tipov stafilokoknih enterotoksinov – od teh je bilo ugotovljeno, da se stafilokokni enterotoksini od A do D pojavljajo pri zastrupitvah s hrano (Atanassova in sod., 2001). Čeprav s pasterizacijo lahko ubijemo

bakterije vrste *S. aureus*, pa njihovi termostabilni enterotoksini kljub visokim temperaturam lahko ostanejo biološko aktivni (Morandi in sod., 2007). Toplotna stabilnost toksina je odvisna od medija v katerem se toksin nahaja, vrednosti pH, koncentracije soli in okolijskih dejavnikov, ki vplivajo na stopnjo denaturacije toksina. Stafilokokni enterotoksini so odporni tudi proti inaktivaciji gastrointestinalnih proteaz, kot je na primer pepsin (Balaban in Rasooly, 2000).

### 2.3 KONTAMINACIJA ŽIVIL Z BAKTERIJAMI VRSTE *S. aureus*

Stafilokoki se lahko v živilih živalskega izvora ali živilih, ki jih pripravljajo ljudje nahajajo v nizkih koncentracijah, razen če niso bili uničeni s postopki toplotne obdelave (Jay, 1992). Bakterije vrste *S. aureus* se lahko od klicenosca ali človeka s stafilokokno okužbo rok prenašajo na živila na več načinov (ZZV - Ce, 2010):

- neposredno z dotikom (v primeru gnojne rane na koži, z rokami klicenoscev)
- kapljično (klicenosci, ki imajo bakterije vrste *S. aureus* v nosno-žrelnem prostoru, izločajo stafilokoke z drobnimi kapljicami, predvsem pri kihanju in kašljanju)
- posredno (preko okuženih predmetov – kuhinjski pripomočki)

Največjo nevarnost za okužbo nam predstavljajo pogrete jedi, kuhana perutnina, kuhano meso, gotove jedi, kreme in sladoledi. Če te jedi shranjujemo pri temperaturah od 10 do 40 °C, omogočamo razmnoževanje stafilokokov in sintezo enterotoksinov. Posebno nevarnost predstavljata tudi mleko krav, obolelih z mastitisom in meso perutnine, ki je bilo okuženo med zakolom. Poleg tega lahko rast in razmnoževanje stafilokokov olajšamo, če smo uničili druge mikroorganizme ali zavrli njihovo rast s kuhanjem, sušenjem, osmotskim pritiskom ali znižano vsebnostjo vode, saj so bakterije vrste *S. aureus* v teh razmerah bolj odporne od večine drugih bakterij. Infekcijska doza je  $10^6$  celic v 1 g živila, saj to število celic izloči dovolj enterotoksina, da se pojavijo bolezenski znaki (Kapun – Dolinar, 2001).

Bakterije vrste *S. aureus* so zelo odporne na zamrzovanje (pri zamrznjenih živilih lahko preživi do temperature  $-20$  °C), odtaljevanje in sušenje. Uničimo jih lahko s toplotno obdelavo (pasterizacija in višje temperature segrevanja), ne moremo pa uničiti enterotoksinov, ki jih izločajo v živilo (ZZV - Ce, 2010).

Nevarnost za kontaminacijo predstavljajo tudi pripomočki, ki jih uporabljamo za pripravo živil (mlinčki, noži, skladiščni pripomočki, rezalne deske in žage) (Aycicek in sod., 2005).

#### 2.3.1 Pogostnost kontaminacije živil z bakterijami vrste *S. aureus*

Normanno in sod. (2005) v svojih študijah navajajo, da so bakterije vrste *S. aureus* zelo razširjene v naravi, zato je zelo verjetno, da so različna živila okužena s temi bakterijami. Z analizami različnih vzorcev živil (mesa in mesnih proizvodov, mleka in mlečnih proizvodov, jajčnih proizvodov, ribjih proizvodov, sladoleda, peciva, testenin in delikatesnih proizvodov) in površin, ki so v kontaktu z živili, so v 1971 vzorcih (od 11384 vzorcev) dokazali prisotnost koagulaza pozitivnih stafilokokov. Od 1971 vzorcev so nato analizirali le 541 vzorcev in v 537 vzorcih (99,3 %) dokazali prisotnost bakterij vrste *S.*

*aureus*. V 5369 analiziranih vzorcih mesa je bilo le v 1245 vzorcih dokazana prisotnost koagulaza pozitivnih stafilokokov (23,1 %); od teh je bilo 148 vzorcev izbranih za nadaljnjo analizo in v 146 vzorcih so dokazali prisotnost bakterije vrste *S. aureus*. Med izbranimi vzorci mesa so bili predvsem razdeto meso (v 1316 vzorcih so dokazali prisotnost bakterije vrste *S. aureus* v 344 vzorcih), sveže meso (v 1639 vzorcih so dokazali prisotnost bakterije vrste *S. aureus* v 512 vzorcih) in zorjeni mesni izdelki (v 339 vzorcih so dokazali prisotnost bakterije vrste *S. aureus* v 58 vzorcih). Pri analizah mleka pa se je pri analiziranih 3079 vzorcih pokazala prisotnost koagulaza pozitivnih stafilokokov pri 641 vzorcih (20,7 %). Od teh vzorcev so za nadaljnjo analizo izbrali 364 vzorcev in v 362 vzorcih dokazali prisotnost bakterij vrste *S. aureus*. Analiza 1515 vzorcev brisov površin, ki prihajajo v kontakt s hrano (noži in rezalne deske), je pokazala le 1,6 % prisotnost bakterij vrste *S. aureus*.

Rosec in sod. (1997) v svojih študijah navajajo, da je bilo pri analizi 121 vzorcev (siri, pecivo, surova ali kuhana svinjina, sladoled, kuhani obroki, mleto meso, koruzni zdrob) izoliranih 264 sevov, v katerih so bile prisotne bakterije rodu *Staphylococcus*. Od tega so 213 sevov identificirali kot bakterij vrste *S. aureus*, med drugimi 51 sevi pa so določili naslednje bakterije iz rodu *Staphylococcus*:

- pri sedmih sevih bakterije vrste *S. epidermidis*,
- pri dveh sevih bakterije vrste *S. cohnii*,
- pri dveh sevih bakterije vrste *S. lugdunensis*,
- pri dveh sevih bakterije vrste *S. capitis*,
- pri dveh sevih bakterije vrste *S. warneri*,
- pri dveh sevih bakterije vrste *S. xylosum*,
- pri enem sevu bakterije vrste *S. hycus*,
- pri enem sevu bakterije vrste *S. haemolyticus*,
- pri enem sevu bakterije vrste *S. sciuri*,
- pri enem sevu bakterije vrste *S. simulans*.

Lopes in sod. (2007) v svojih študijah navajajo, da so pri analizi 189 kliničnih vzorcev (kri, urin, vzorci iz nosnic) v 69 vzorcih odkrili bakterije vrste *S. epidermidis*, v 44 vzorcih bakterije vrste *S. haemolyticus*, v 25 vzorcih bakterije vrste *S. hominis* in v 17 vzorcih bakterije vrste *S. aureus*. Vzorci so bili odvzeti bolnikom v brazilskih bolnišnicah med letom 2001 in 2006.

Poleg prisotnosti bakterij vrste *S. aureus* pa je pomembna tudi prisotnost enterotoksinov, saj so odgovorni za izbruh bolezni, ki jo povzroči zastrupitev s hrano, okuženo z bakterijami vrste *S. aureus* (Kerouaton in sod., 2007). Houng in sod. (2010) v svojih študijah navajajo, da so v 45 vzorcih od 121 vzorcev živil, kot so mleko, sladoled, lepljiv riž, riževe tortice, fermentirani mesni izdelki, pečeno svinjsko meso in »nem chao« potrdili prisotnost bakterij vrste *S. aureus* in v teh 45 vzorcih dokazali prisotnost 18 sevov (40 %), ki so proizvajali stafilokokne enterotoksine. Tudi Normanno in sod. (2005) navajajo, da so pri 537 vzorcih živil (mesa in mesnih proizvodov, mleka in mlečnih proizvodov, jajčnih proizvodov, ribjih proizvodov, sladoleda, peciva, testenin in delikatesnih proizvodov) v 55,5 % določili bakterije vrste *S. aureus*, ki proizvajajo



enterotoksine. Pereira in sod. (2009) pa so v svojih študijah v 148 vzorcih živil (meso in fermentirani mesni proizvodi, siri in mleko) odkrili 69 % prisotnost bakterij vrste *S. aureus*, ki proizvajajo enterotoksine.

Podatki za Slovenijo, ki jih je navedla Evropska agencija za varnost hrane (2008) v svojih raziskavah kažejo, da pri preiskavah 83 vzorcev mlečnih proizvodov, 100 vzorcev sladoleda, 100 vzorcev sira in 40 vzorcev delikatesnih jedi z daljšim rokom uporabe (klobase, jetrne paštete, različni namazi, svinjska mast in tlačenke) ter 100 vzorcev delikatesnih jedi s toplotno obdelanim piščančjim mesom (sendviči, solate, paštete, namazi) stafilokoknih enterotoksinov niso odkrili. Kljub temu so zabeležili izbruh bolezni pri 40 ljudeh (od 700 ljudi). Povzročil ga je stafilokokni enterotoksin C, ki so ga odkrili v ajdovi kaši.

Pomanjkanje ustreznih higienskih ukrepov med pripravo hrane je eden glavnih vzrokov in virov kontaminacije, saj so ljudje, ki pripravljajo in prodajajo hrano, nosilci patogenih bakterij. Ustrezno razumevanje in obsežno znanje o kontaminaciji živil z bakterijami vrste *S. aureus* lahko pripomore k lažjemu in bolj učinkovitemu nadzoru bolezni (Houng in sod., 2010).

## 2.4 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE *S. aureus*

Zanesljiva in ponovljiva identifikacija bakterij rodu *Staphylococcus* je problem, s katerim se sooča veliko laboratorijev. Zaradi velike nevarnosti okužbe ljudi s stafilokoki in njihovimi enterotoksini moramo imeti na voljo zanesljive metode izolacije in identifikacije, saj le tako lahko zagotovimo ustrezne podatke za kontrolo in nadaljnje epidemiološke analize živil. Referenčne metode, ki so priporočene za identifikacijo, so zanesljive, vendar okorne za uporabo v laboratoriju. Poleg tega pa je za te metode tudi značilna dolgotrajnost, saj so rezultati znani šele po 5 – 7 dnevih. Čeprav je bilo v zadnjih desetletjih razvitih veliko fenotipskih in genotipskih metod, kot alternativa referenčnim metodam, pa so tudi te pokazale določene slabosti, kot so visoki stroški, posebej izobražen kader, dolgotrajen inkubacijski čas in pa slaba natančnost (Lopes Pontes Ilorio, 2007).

Metode evropske in mednarodne organizacije za standardizacijo za izolacijo in kvantifikacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov predpisujejo uporabo gojišča Baird–Parker (BP) in uporabo agarja z zajčjo krvno plazmo (De Buyser in sod., 2003). Standard EN ISO 6888 – 1: 1997 (E) navaja, da se za kvantifikacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov v proizvodih, ki se jih uporablja za prehrano ljudi ali za hranjenje živali uporablja štetje in potrditev kolonij, ki zrastejo po aerobni inkubaciji pri 35 ali 37 °C na gojišču Baird – Parker. Standard navaja, da ga pripravimo po navodilih proizvajalca. Po končani inkubaciji je potrebno potrditi zrasle kolonije kot koagulaza pozitivne stafilokoke. Za potrditev se uporabi zajčja plazma, ki jo po navodilih standarda EN ISO 6888 – 1: 1997 (E) pripravimo po navodilih proizvajalca. Število koagulaza pozitivnih stafilokokov podamo v cfu/ml ali v cfu/g.

De Buyser in sod. (2003) v svojih študijah navajajo uporabo BP gojišča in agarja z zajčjo plazmo (RPFA – ang. rabbit plazma fibriogen agar) za določanje števila koagulaza pozitivnih stafilokokov v vzorcih mesa, sira in jajčnega praha. Vzorce so inkubirali pri 37 °C 24 in 48h, ter po končani inkubaciji potrdili prisotnost koagulaza pozitivnih

stafilokokov in določili njihovo število. Rezultati raziskav so pokazali, da sta obe metodi za določanje koagulaza pozitivnih stafilokokov zelo natančni (določanje koagulaza pozitivnih stafilokokov na gojišču RPFa je še nekoliko bolj natančna metoda, kot določanje števila koagulaza pozitivnih stafilokokov na BP gojišču). Raziskava je tudi pokazala, da bi bilo potrebno izboljšati opis izgleda kolonij na BP gojišču.

Vicosa in sod. (2010) navajajo, da je potrebno, kadar uporabljamo gojišče BP za določanje koagulaza pozitivnih stafilokokov, določiti tipične kolonije s pomočjo biokemijskih lastnosti, da bi lahko ovrednotili enterotoksigeni potencial bakterij. Izbranim kulturam določimo morfološke lastnosti, prisotnost katalaze, koagulaze in termonukleaze (ta dva encima sta velikokrat povezana z zmožnostjo tvorbe enterotoksina) in jih pobarvamo po Gramu. Ne glede na široko uporabo pa se lahko pri uporabi gojišča BP pojavijo težave kot so nizka selektivnost, dolgotrajnost metode in nepravilnost rezultatov pri štetju kolonij. Zaradi vseh teh omejitev se je za štetje bakterij iz rodu *Staphylococcus* predlagal alternativni kultivacijski medij. Mednarodna organizacija za standarde (International Organization for Standardization – ISO) predlaga uporabo RPFa. Le ta omogoča ločevanje med koagulaza pozitivnimi in negativnimi stafilokoki. Tako lahko opust potrimodivne teste, ki so potrebni pri uporabi gojišča BP. Kot druga alternativa pa se lahko uporablja Petrifilm Staph Express (STX), ki je zelo uporaben v živilski industriji, saj je primeren za določanje števila mikroorganizmov v starter kulturi, lahko pa se uporablja tudi kot indikator higiene. To gojišče nam omogoča določanje tistih stafilokokov, ki so sposobni proizvajati DNA – zo.

Za identifikacijo bakterij rodu *Staphylococcus* uporabljamo različne teste. Bergijev priročnik (Bergey's manual..., 1994) navaja za razlikovanje med posameznimi vrstami in podvrstami bakterij rodu *Staphylococcus* sledeče karakteristike:

- Barva kolonij
- Aerobna rast
- Anaerobna rast
- Rast v slanem bujonu (pri 15 % NaCl ali 10 % NaCl)
- Rast pri 15 °C ali 45 °C
- Oksidazni test
- Proizvodnja mlečne kisline in acetoin
- Izkoriščanje različnih sladkorjev (ksilozna, arabinoza, celobioza, rafinoza, saharoza, maltoza, manoza, trehaloza, laktoza, fruktoza, riboza)
- Izkoriščanje manitola, ksilitola in salicina
- Rast na gojišču z (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (vir dušika)
- Redukcija nitrata
- Hemoliza
- Koagulazni test
- Koagulacijski faktor
- Odpornost na novobiocin
- Prisotnost encimov kot so DNA – za, alkalni fosfataza, arginin dihidrolaza, β – glukozidaza, β – glukoronidaza, β – galaktozidaza, ureaza, fibrinolizin

Poleg tega lahko za identifikacijo bakterij uporabimo tudi barvanje po Gramu kot ga navaja Duraković (1991).

### 3 MATERIALI IN METODE DE LA

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorc i živil

Bakterije rodu *Staphylococcus* smo izolirali iz naslednjih vzorcev:

- Čokoladna torta (Mercator d.d. slaščičarska delavnica in prodajalna Kranjski kolaček, Kranj)
- Frik sendvič (Don Don d.o.o, Metlika)
- Goveja pljuča (KGZ Idrija z.o.o., Idrija)
- Goveja jetra (KGZ Idrija z.o.o., Idrija)
- Indijanček (Žito d.d., Ljubljana)
- Ježek (Mercator d.d. slaščičarska delavnica in prodajalna Kranjski kolaček, Kranj)
- Kremna rezina (Mercator d.d. slaščičarska delavnica in prodajalna Kranjski kolaček, Kranj)
- Mali študentski sendvič (Don Don d.o.o, Metlika)
- Mega sendvič (Don Don d.o.o, Metlika) (2 vzorca)
- Piščančja bedra (Pivka d.d., Kal)
- Piščančja jetra (Pivka d.d., Kal)
- Piščančja jetra in srce (Pivka d.d., Kal)
- Piščančja krila (Pivka d.d., Kal) (5 vzorcev)
- Piščančji file (Perutnina Ptuj d.d., Ptuj)
- Razdeto mešano meso (Mercator d.d., Ljubljana) (5 vzorcev)
- Sezamova štručka z tuninim namazom (Don Don d.o.o, Metlika)
- Sendvič angleški poli (Mlinotest živilska industrija d.d., Ajdovščina)
- Svinjska jetra (Mesna industrija Radgona d.d., Gornja Radgona) (4 vzorci)
- Višnjeva torta (Mercator d.d. slaščičarska delavnica in prodajalna Kranjski kolaček, Kranj)

##### 3.1.2 Reagenti

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje reagente:

- 4 M NaOH (Merck, Darmstad Nemčija)
- 1 M HCl (Merck, Darmstad Nemčija)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.07873.0250; Merck; Darmstad Nemčija)
- NaCl (1.06404.1000; Merck; Darmstad Nemčija)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.07209.1000; Merck; Darmstad Nemčija)
- 1,6 % timol modro (540533; Zagreb Hrvaška)
- Fenol rdeče (32661; Riedel – De Haen Ag; Seelze – Hanover Nemčija)
- Kristal vijolično barvilo (1.15945.0025; Merck; Darmstad Nemčija)
- Lugol (1.09261.1000; Merck; Darmstad Nemčija)

- Etanol (1.00971.2500; Merck; Darmstad Nemčija)
- Safrain (1.15948.0025; Merck; Darmstad Nemčija)

### 3.1.3 Gojišča

Gojišče Baird-Parker agar (401116; Biolife; Milano Italija) smo pripravili po navodilih proizvajalca.

Druga gojišča in fiziološko raztopino smo pripravili na sledeči način:

Fiziološka raztopina:

V 100 ml čašo smo natehtali 3,4 g  $K_2HPO_4$  in dodali 500 ml destilirane vode ter vse skupaj dobro raztopili. Raztopino smo nevtralizirali z 3M NaOH do pH 7,2. Nato smo vse skupaj prelili v 100 ml bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake. 2,5 ml tako pripravljene raztopine smo prenesli v 2000 ml bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

Gojišče z glukozo (manitol ( 540699; Kemika; Zagreb Hrvaška)):

V 500 ml steklenico smo zatehtali 1,5 g mesnega ekstrakta (1125; Biolife; Milano Italija) 2,5 g peptona (412259; Biolife; Milano Italija) in 5 g glukoze (720368; Kemika; Zagreb Hrvaška). Z 4 M NaOH smo uravnali pH gojišča (6,8 – 7,0) na 6,9. Nato smo dodali še 1,6% raztopino indikatorja timol modro in razlili gojišče po 7 ml v epruvete ter dodali durhamove cevke. Gojišče smo 20 minut sterilizirali pri 121°C.

Gojišča z različnimi sladkorji (ramnoza (1.07361.0025; Merck; Darmstad Nemčija), saharoza (720102; Kemika; Zagreb Hrvaška), fruktoza (06245 ; Kemika; Zagreb Hrvaška), riboza (1.07605.0050; Merck; Darmstad Nemčija), galaktoza (0700512; Kemika; Zagreb Hrvaška), laktoza (2826; Torlak; Beograd Srbija)):

V 250 ml steklenico smo natehtali 2 g peptona (412259 ;Biolife; Milano Italija), 0.2 g govejega bujona (1125; Biolife; Milano Italija), 1 g NaCl in 1 g ustreznega sladkorja, pH gojišča smo uravnali s pomočjo NaOH ali HCl na 7,4. Nato smo na folijo natehtali 0,0036 g indikatorja fenol rdeče in ga dodali v stekleničko z gojiščem. Gojišče smo nato razlili v epruvete po 7 ml in jih 20 minut sterilizirali pri 121°C.

Gojišče DNA-zni agar:

V 1000 ml steklenico smo zatehtali 20 g triptoze, 2 g deoksiribonukleinske kisline, 5 g NaCl in 12 g DNA – znega agarja ter dopolnili z destilirano vodo do oznake. Sterilizirali smo v avtoklavu pri 15 min pri 121°C (Oxoid Manual, 1998).

Gojišče tripton soja agar:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 20 g tripton soja agarja (640581; Oxid; Basingstoke, Hampshire Velika Britanija), 1,25 g  $K_2HPO_4$ , 1,25 g glukoze in 3 g kvasnega ekstrakta(412220; Biolife; Milano Italija) ter dolili 500 ml vode. Vsebinsko smo raztopili v

mikrovalovni pečici in nato sterilizirali 20 minut pri 121°C ter razlili v sterilne petrijevke po 15 ml.

#### Gojišče BHI (Brain Heart Infusion):

19 g BHI (1.10493.0500; Merck; Darmstadt Nemčija) gojišča smo natehatali v 500 ml steklenico in dodali 500 ml vode. Gojišče smo dobro raztopili v mikrovalovni pečici in ga razlili v epruvete po 4 ml. Epruvete smo avtoklavirali 20 minut pri 121°C.

#### Gojišče z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :

Za pripravo 2x po 500 ml gojišča smo natehatali v steklenico 10 g glukoze (720368; Kemika; Zagreb Hrvaška), 0,5 g magnezijevega sulfata – heptahidrata (1.05886.0500; Merck; Darmstadt Nemčija) in 12 g agarja (Agar bacteriological (agar bios special LL); 4110302; Biolife; Milano Italija). V steklenico smo dodali 2,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (01349; Kemika; Zagreb Hrvaška) in sterilizirali 15 min pri 121°C ter razlili v petrijevke.

#### Gojišče z zajčjo krvno plazmo (Coagulase plasma, rabbit with EDTA; 240826; Becton Dickinson; Mareyland ZDA):

15 ml sterilne destilirane vode smo prenesli v stekleničko s prahom zajčje krvne plazme, vsebino smo homogenizirali in aseptično razdelili po 0,5 ml v sterilne epruvete.

#### Slani bujon:

12,5 g govejega bujona (1125; Biolife; Milano Italija) smo raztopili v 500 ml destilirane vode in dodali 75 g NaCl. Nato smo gojišče razlili v epruvete po 7 ml in jih 20 min avtoklavirali pri 121 °C.

### **3.1.4 Laboratorijska oprema**

Pri našem delu smo uporabljali sledečo laboratorijsko opremo:

- Inkubator (Kambič, Laboratorijska oprema; Slovenija; Tip: I – 115C)
- Mikrovalovna pečica (Sango cook n`grill 1300; Shower wawe)
- Mikroskop (Motic, Model: BA210; serijska številka: 1100000586)
- Tehnica (Metler Toledo; MonoBloc inside Weigling technology; PB 1502 – S)
- Vrtno mešalo (Yellow libre TTS2; Tip: I; ZDA)

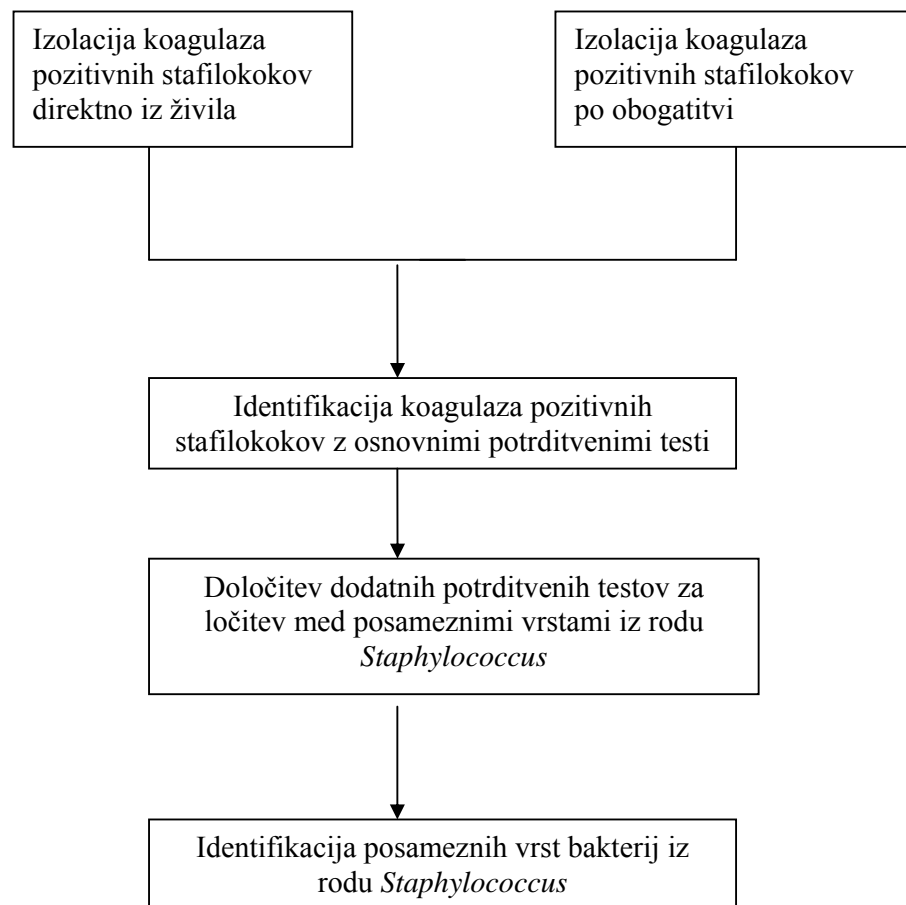
Poleg naštetih opreme smo uporabljali tudi avtomatske pipete, epruvete, gorilnike, petrijevke, nastavke za pipete, steklenice, čaše, košare, merilne valje, kapalke, objektna stekelca in eze.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Potek eksperimentalnega dela

Naš eksperiment je potekal v treh delih (slika 1):

- Izolacija koagulaza pozitivnih stafilocokov direktno iz živil ali po obogatitvi živila s klasičnimi metodami izolacije
- Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilocokov z osnovnimi potrditvenimi testi
- Na podlagi rezultatov, pridobljenih z osnovnimi potrditvenimi testi, smo določili še dodatne potrditvene teste za ločitev med posameznimi vrstami bakterij rodu *Staphylococcus*.



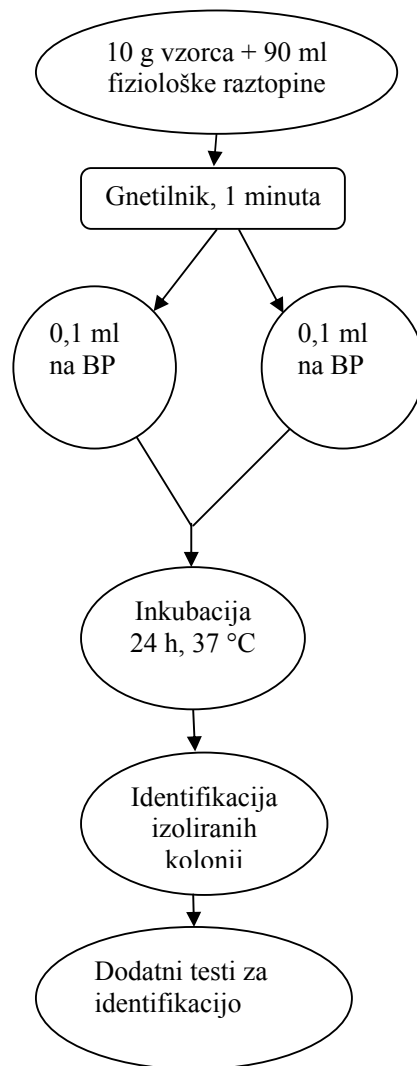
Slika 1: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela

### 3.2.2 Izolacija koagulaza pozitivnih stafilokokov

Koagulaza pozitivne stafilokoke smo iz živil izolirali direktno ali po obogatitvi živila (ISO/DIS 6888 – 1, 1997).

#### a) Direktna izolacija koagulaza pozitivnih stafilokokov

Na analitsko tehtnico smo postavili košarico in vanjo vrečko, v katero smo natehtali 10 g vzorca živila, dolili 90 ml fiziološke raztopine in nato vsebino 1 minuto homogenizirali v gnetilniku. Po 0,1 ml suspenzije smo razmazali na gojišče Baird-Parker in plošče 24-48 ur inkubirali pri 37 °C. Za vsak vzorec živila smo naredili 2 paralelki. Po končani inkubaciji smo na gojišču Baird – Parker prešteli zrasle kolonije in izračunali število koagulaza pozitivnih stafilokokov v živilih.

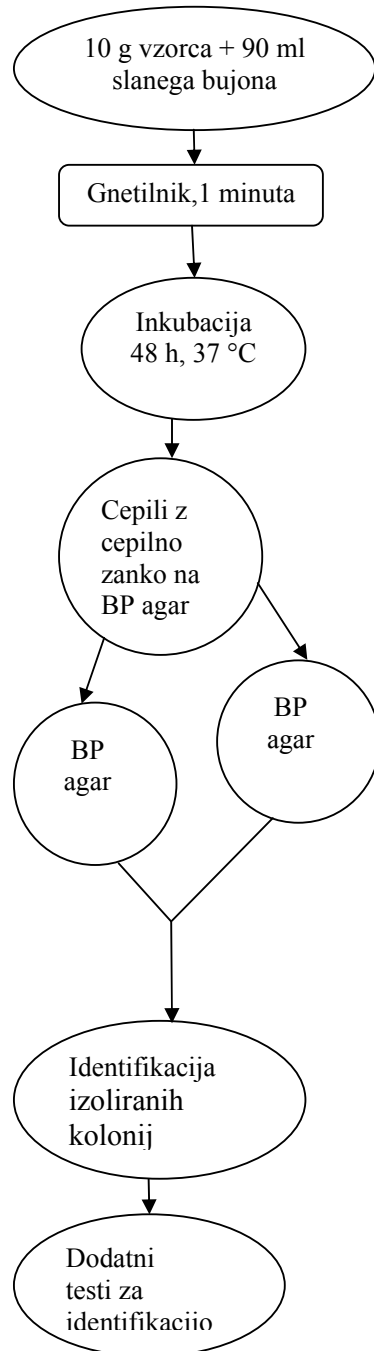


Slika 2: Izolacija in identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov direktno iz živila



b) Izolacija koagulaza pozitivnih stafilokokov po obogatitvi

Na analitsko tehtnico smo postavili košarico in vanjo vrečko, v katero smo natehtali 10 g vzorca živila, dolili 90 ml slanega bujona in nato vsebino 1 minuto homogenizirali v gnetilniku. Po homogenizaciji smo postavili vrečke z vzorci v inkubator (37 °C) za 48 ur.



Slika 3: Izolacija in identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov po obogatitvi v slanem bujonu

### 3.2.3 Identifikacija bakterij vrste *Staphylococcus aureus*

Za identifikacijo bakterij vrste *S. aureus* smo uporabili teste, navedene v Bergijevem priročniku (Bergey's manual..., 1994). Kot osnovne teste za identifikacijo smo izbrali barvanje po Gramu, katalazni test, izkoriščanje glukoze in manitola ter DNA- zni test. Glede na rezultate teh testov smo določili, katere vrste bakterije rodu *Staphylococcus* so domnevno prisotne v naših vzorcih. Z dodatnimi testi za identifikacijo smo identificirali posamezne vrste rodu *Staphylococcus*.

#### 3.2.3.1 Barvanje po Gramu

##### a) Priprava razmaza:

Na objektno steklice smo s kapalko kanili kapljico destilirane vode. Z ezo smo prenesli del kolonije iz gojišča TSA in jo razmazali po stekelcu. Nato smo pri plamenu gorilnika razmaz posušili in ga fiksirali.

##### b) Postopek barvanja po Gramu:

- Razmaz smo barvali s kristalno vijoličnim barvilom 2 minuti
- Razmaz smo z rahlim curkom sprali pod vodovodno vodo
- Razmaz smo barvali z lugolom 2 minuti
- Razmaz smo sprali z etanolom in nato z vodo
- Razmaz smo barvali 30 sekund s safarinom
- Razmaz smo sprali z vodo in osušili z papirnato brisačo

Tako pripravljen preparat smo imerzijsko mikroskopirali in poleg reakcije po Gramu smo na razmazu opazovali tudi obliko in formacijo celic (Duraković, 1991).

#### 3.2.3.2 Katalazni test

Na objektno steklice smo s kapalko kanili kapljico destilirane vode in z ezo prenesli eno kolonijo iz TSA gojišča in jo razmazali po kapljici destilirane vode. Nato smo na razmaz kapnili kapljico vodikovega peroksida. Če so se na razmazu pojavili mehurčki kisika, je bil test pozitiven, kar pomeni, da bakterije imajo encim katalazo. Če pa se mehurčki niso pojavili, je bil test negativen, kar pomeni, da bakterije nimajo encima katalaze.

#### 3.2.3.3 Izkoriščanje glukoze in drugih sladkorjev (maltoza, saharoza, riboza, galaktoza, laktoza)

V 9 ml fiziološke raztopine smo s cepilno zanko prenesli eno kolonijo iz gojišča TSA in jo dobro premešali. Nato smo z avtomatsko pipeto prenesli 1 ml suspenzije v epruveto z gojiščem z glukozo (in drugimi sladkorji) in vsebino dobro premešali. Suspenzijo smo inkubirali 48 ur pri 37 °C. Pozitiven rezultat tega test je bil sprememba barve gojišča, s čimer smo dokazali, da bakterije izkoriščajo glukozo ali enega izmed omenjenih sladkorjev. Pri negativnem rezultatu pa je barva gojišča ostala nespremenjena, kar pomeni da bakterije ne izkoriščajo omenjenih sladkorjev.

#### 3.2.3.4 Izkoriščanje manitola

V 9 ml fiziološke raztopine smo s cepilno zanko prenesli eno kolonijo iz gojišča TSA in jo dobro premešali. Nato smo z avtomatsko pipeto prenesli 1 ml suspenzije v gojišče, ki je vsebovalo manitol in vse skupaj inkubirali 24 ur pri 37 °C. Pozitiven rezultat pri tem testu je bil sprememba barve gojišča, s čimer smo dokazali da bakterije izkoriščajo manitol.

#### 3.2.3.5 DNA-zni test

Gojišče DNA-zni agar smo s skalpelom razdelili na štiri dele. Nato smo z cepilno zanko na vsako četrtino nanesti vzorec in inkubirali 24 h pri 37 °C. Pozitiven rezultat pri tem testu je bil rast kolonij in prozorno gojišče okolij kolonij, kar nakazuje na prisotnost encima DNA – ze.

#### 3.2.3.6 Koagulazni test

V epruvete, v katerih je 0,5 ml krvne zajčje plazme smo s cepilno zanko prenesli 1 kolonijo iz TSA gojišča, dobro premešali in inkubirali 24 h pri 37 °C. Rezultate smo odčitavali v določenih časovnih intervalih (2h, 4h, 8 h in 24 h). Pozitiven rezultat je bil, če smo na dnu epruvete opazili koagulum, kar pomeni, da bakterije imajo encim koagulazo. Negativen rezultat pa pomeni, da se koagulum v epruveti ni pojavil.

#### 3.2.3.7 Hemoliza

Kolonijo smo precepili z gojišča TSA na gojišče z krvnim agarjem in inkubirali 24 h pri 37 °C. Opazovali smo barvo kolonij in pojav  $\alpha$  in  $\beta$  - hemolize.

#### 3.2.3.8 Rast bakterij pri različnih temperaturah (15 °C in 45 °C)

Del kolonije, značilne za bakterije vrste *S. aureus*, smo z gojišča BP smo precepili na gojišči TSA in eno inkubirali 4 dni pri 15 °C, drugo pa 4 dni pri 45 °C. Opazovali smo rast bakterij rodu *Staphylococcus* pri 15 °C in 45 °C.

#### 3.2.3.9 Rast bakterij v gojišču s 15 % NaCl

Del kolonije smo precepili z TSA gojišča v slani bujon, ki vsebuje 15 % NaCl in ga inkubirali 48 h pri 37 °C. Opazovali smo rast bakterij rodu *Staphylococcus*.

#### 3.2.3.10 Rast bakterij v anaerobnih razmerah

Del kolonije značilne za bakterije vrste *S. aureus* smo z gojišča BP smo precepili na gojišče TSA. Nato smo gojišče v posodi za anaerobno inkubacijo inkubirali 48 h pri 37 °C.

## 4 REZULTATI

Z klasičnimi metodami izolacije in identifikacije smo v različnih vzorcih živil (meso, drobovina, sladice in sendviči) določili koagulaza pozitivne stafilokoke. Vzporedno smo uporabili direktno izolacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov na gojišču BP in obogatitev vzorca živila v slanem bujonu ter naknadno izolacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov na gojišču BP. Z identifikacijskimi testi, ki smo jih izvedli v dveh stopnjah, (osnovni testi in dodatni testi), smo identificirali posamezne vrste bakterij rodu *Staphylococcus* v določenih vzorcih živil

### 4.1 ŠTEVILO KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKOV V ŽIVILIH

S klasično metodo izolacije smo določili število stafilokoke v različnih živilih. Po inkubaciji gojišč BP, na katerih smo izolirali stafilokoke iz različnih živil, smo prešteli značilne kolonije, ter iz dobljenih podatkov izračunali število stafilokokov v naših vzorcih. Rezultati so prikazani v preglednici 1.

**Preglednica 1: Skupno število stafilokokov v različnih vzorcih živil**

Številka vzorca in ime	Skupno število stafilokokov v živilu [cfu/g]
1: razdeto mešano meso	$2,98 \times 10^4$
2: svinjska jetra	$1,15 \times 10^5$
3: piščančja krila	$6,50 \times 10^2$
4 : goveja pljuča	$7,00 \times 10^2$
5 : piščančja jetra	$1,50 \times 10^2$
6: razdeto mešano meso	$6,86 \times 10^5$
7: svinjska jetra	$1,50 \times 10^2$
8 : piščančja bedra	$5,00 \times 10^2$
9: piščančja krila	$3,90 \times 10^3$
10: mega sendvič	$5,38 \times 10^4$
11: študentski sendvič	$5,03 \times 10^4$
12: sezamova štručka z tuninim namazom	$1,00 \times 10^2$
13: mega sendvič	$3,79 \times 10^5$
14: sendvič angleški poli	$3,50 \times 10^2$
15: frik sendvič	$5,00 \times 10^1$
16: indijanček	$3,00 \times 10^2$
17: ježek	$1,45 \times 10^5$
18: kremšnita	$5,00 \times 10^1$
19: čokoladna torta	$1,00 \times 10^3$
20: višnjeva torta	$5,00 \times 10^1$
21: razdeto mešano meso	$1,28 \times 10^5$
22: piščančja krila	$4,95 \times 10^3$
23: svinjska jetra	$2,00 \times 10^2$
24: razdeto mešano meso	$1,44 \times 10^5$
25: piščančja krila	$1,95 \times 10^3$
26: svinjska jetra	$4,00 \times 10^2$
27: razdeto mešano meso	$1,09 \times 10^5$
28: piščančja krila	$2,15 \times 10^3$
29: piščančji file	$1,50 \times 10^2$
30: goveja jetra	$7,50 \times 10^2$
31: piščančja jetra in srce	$5,00 \times 10^2$

V preglednici 1 so zbrani rezultati izolacije bakterij rodu *Staphylococcus* po izolaciji in kvantifikaciji na BP gojišču. Rezultati analiz so pokazali, da je bilo skupno število stafilokokov v razponu od  $1 \times 10^2$  do  $6,86 \times 10^5$  cfu/g.

#### 4.2 REZULTATI OSNOVNIH TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ VRSTE *S. aureus*

Z osnovnimi testi za identifikacijo bakterij rodu *Staphylococcus* smo določili domnevno prisotne vrste stafilokokov v posameznem živilu. Na osnovi dobljenih rezultatov smo s pomočjo ustreznih literaturnih podatkov (Board of Trustees of Bergey's manual Trust, 1994) določili še dodatne potrditvene teste za ločitev med posameznimi vrstami bakterij iz rodu *Staphylococcus*. Rezultate smo združili po posameznih skupinah živil in so prikazani v preglednicah od 2 do 14.

**Preglednica 2: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev razdetega mešanega mesa z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
1	Direktno iz živila	A <sub>1</sub>	Oranžno - bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	-	<i>S. cohnii</i> ( <i>cohnii</i> ) <i>S. haemolyticus</i> <i>S. kloosi</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. xylosus</i>	Anaerobna rast, rast pri 15°C, izkoriščanje saharoze in galaktoze
		A <sub>2</sub>	Oranžno - bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i>	anaerobna rast, izkoriščanje riboze
		A <sub>3</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i>	anaerobna rast, izkoriščanje riboze
	Po obogatitvi	A <sub>4</sub>	Bež - rumena	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. warneri</i>	anaerobna rast, rast pri 15% NaCl, rast pri 15°C, rast v prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
6	Direktno iz živila	A <sub>21</sub>	Rumena	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i>	anaerobna rast, izkoriščanje riboze
	Po obogatitvi	A <sub>22</sub>	Oranžna	Koki, grozdi, Gr+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje

**Nadaljevanje preglednica 2: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev razdetega mešanega mesa z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
21	Direktno iz živila	A <sub>52</sub>	Belo-bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
		A <sub>53</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	/	<i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast
	Po obogatitvi	A <sub>54</sub>	Oranžno	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	nedoločljivo	/
24	Direktno iz živila	A <sub>61</sub>	Rumeno-bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	/	mikrokoki	/
		A <sub>62</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	/	<i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. chleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast
	Po obogatitvi	A <sub>63</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i>	ni ustreznega testa
27	Direktno iz živila	A <sub>70</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
		A <sub>71</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
	Po obogatitvi	A <sub>72</sub>	Rumena	Koki, grozdi, Gr+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	/

Rezultati identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokokov so pokazali, da se v dveh od petih vzorcev razdetega mešanega mesa nahajajo bakterije vrste *Staphylococcus aureus* v ostalih vzorcih pa smo določili še ostale domnevne vrste stafilokokov. Glede na literaturne podatke (FDA, 2001; Bergey`s manual..., 1994) smo določili še dodatne teste za identifikacijo bakterij rodu *Staphylococcus*.



**Preglednica 3: Identifikacija kogulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev svinjskih jeter z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva Kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
2	Direktno iz živila	A <sub>5</sub>	Rumena	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. hominis</i>	/
		A <sub>6</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. auricularis</i>	/
		A <sub>7</sub>	Bež z oranžnimi robovi	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. hominis</i>	/
	Po obogatitvi	A <sub>8</sub>	Oranžno – rumena	Koki, grozdi, Gr+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	/
7	Direktno iz živila	A <sub>23</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. capitis (capitis)</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze, maltoze, saharoze, riboze
	Po obogatitvi	A <sub>24</sub>	Oranžna	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. warneri</i>	anaerobna rast, rast pri 15%NaCl, rast pri 15°C, rast pri prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
23	Direktno iz živila	A <sub>58</sub>	Oranžno - bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	/	mikrokoki	/
		A <sub>59</sub>	Oranžno – bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	/	mikrokoki	/
	Po obogatitvi	A <sub>60</sub>	Oranžno	Koki, grozdi, Gr+						<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i>	ni ustreznega testa
26	Direktno iz živila	A <sub>67</sub>	Oranžno – bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. caseolyticus</i> <i>S. hominis</i> <i>S. lugdimensis</i>	ni ustreznega testa
		A <sub>68</sub>	Oranžno – bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	/	<i>S. arlettae</i> <i>S. chromogenes</i>	anaerobna rast
	Po obogatitvi	A <sub>69</sub>	Oranžno	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i>	ni ustreznega testa

Pri analizi štirih vzorcev svinjskih jeter smo v vzorcu št. 2 dokazali prisotnost bakterij vrste *S. aureus*. Poleg bakterij vrste *S. aureus* smo v tem vzorcu dokazali še prisotnost bakterij vrst *S. hominis* in *S. auricularis*.

Za vzorec številka 7 in vzorec številka 26 (izolacija direktno iz živil) smo s pomočjo literaturnih podatkov (FDA, 2001; Bergey's Manual..., 1994) določili dodatne potrditvene teste za ločevanje med posameznimi vrstami rodu *Staphylococcus*. Za ostale vzorce nismo našli ustreznega testa za razlikovanje med posameznimi vrstami stafilokokov.

**Preglednica 4: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih kril z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacij	Predvideni dodatni testi
3	Direktno iz živila	A <sub>9</sub>	Oranžno - bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. hominis</i>	/
		A <sub>10</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. auricularis</i>	/
		A <sub>11</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
		A <sub>12</sub>	Bež z oranžnimi robovi	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	+	+	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. warneri</i>	anaerobna rast, rast pri 15%NaCl,rast pri 15°C, rast pri prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		A <sub>13</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	-	+	+	<i>S. capitis (capitis)</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosous</i> <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze, maltoze, saharoze
	Po obogatitvi	A <sub>14</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. warneri</i>	anaerobna rast, rast pri 15%NaCl,rast pri 15°C, rast pri prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
9	Direktno iz živila	A <sub>27</sub>	Bež	Koki, grozdi, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. capitis (capitis)</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosous</i> <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze, maltoze, saharoze, riboze
	Po obogatitvi	A <sub>28</sub>	Oranžna	Koki, grozdi, Gr+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	/

Se nadaljuje

Nadaljevanje

**Nadaljevanje preglednica 4: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih kril z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
22	Direktno iz živila	A <sub>55</sub>	Belo-bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi (schleiferi)</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
		A <sub>56</sub>	Belo-bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi (schleiferi)</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
	Po obogatitvi	A <sub>57</sub>	Oranžno	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i>	ni ustreznega testa
25	Direktno iz živila	A <sub>64</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi (schleiferi)</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
		A <sub>65</sub>	Oranžno	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	/	mikrokoki	/
	Po obogatitvi	A <sub>66</sub>	Oranžno	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i>	ni ustreznega testa

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

### Nadaljevanje preglednica 4: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih kril z osnovnimi testi

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
28	Direktno iz živila	A <sub>73</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	+	/	<i>S. capitis (capitis)</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> <i>S. cohnii (cohnii)</i> <i>S. equorum</i> <i>S. felis</i> <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze, hemoliza
		A <sub>74</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. capitis (capitis)</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> <i>S. cohnii (cohnii)</i> <i>S. equorum</i> <i>S. felis</i> <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje saharoze
	Po obogatitvi	A <sub>75</sub>	Rumena	Koki, grozd, Gr+	+	+	+	+	/	<i>S. aureus</i>	/

Pri izolaciji koagulaza pozitivnih stafilokokov iz petih vzorcev piščančjih kril smo pri dveh vzorcih številka 28 in 9 (izolacija po obogatitvi) izolirali bakterije vrste *S. aureus*. Pri ostalih vzorcih (vzorci št. 3, 9 (izolacija direktno iz živila), 22, 25 in 28 (izolacija direktno iz živila)) pa smo dokazali prisotnost drugih vrst iz rodu *Staphylococcus*. Za te vzorce smo s pomočjo literaturnih podatkov (FDA, 2001; Bergey's manual..., 1994) določili dodatne potrditvene teste za ločevanje med posameznimi vrstami.

**Preglednica 5: Identifikacija kogaulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev govejih pljuč in jeter z osnovnim testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
4	Direktno iz živila	A <sub>15</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. auricularis</i>	/
		A <sub>16</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. auricularis</i>	/
		A <sub>17</sub>	Rumena	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i>	anaerobna rast, izkoriščanje riboze
	Po obogatitvi	A <sub>18</sub>	Oranžno rumena	Koki, grozd, Gr+	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>	/
30	Direktno iz živila	A <sub>78</sub>	Bež	Palčke, Gr-	+	-	-	-	/	nedoločljivo	/
		A <sub>79</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
	Po obogatitvi	A <sub>80</sub>	Rumena - oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	+	+	+	/	<i>S. aureus</i>	/

Pri izolaciji koagulaza pozitivnih stafilokokov smo iz vzorca govejih pljuč (vzorec številka 4) izolirali po obogatitvi bakterije vrste *S.aureus*, pri izolaciji direktno iz živila pa smo dokazali pri izolatih A<sub>15</sub> in A<sub>16</sub> prisotnost bakterij vrste *S. auricularis*, pri koloniji A<sub>17</sub> pa smo dokazali prisotnost bakterij vrste *S. hominis* in *S. epidermidis*. Za ločitev med tema dvema vrstama smo glede na literaturne podatke (FDA, 2001 in Board of Trustes of Bergey's Manual Trust, 1994) literature določili dodatne teste.

Pri vzorcu številka 30 (goveja jetra) pa smo pri izolaciji po obogatitvi določili bakterije vrste *S. aureus*, pri direktni izolaciji koagulaza pozitivnih stafilokokov iz živil pa smo določili ostale vrste bakterij iz rodu *Staphylococcus* in s pomočjo literaturnih podatkov (FDA, 2001; Bergey's manual..., 1994) določili dodatne potrditvene teste za ločevanje med posameznimi vrstami bakterij.

**Preglednica 6: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih jeter, piščančjih beder, piščančjega fileja ter piščančjih jeter in srca z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
5	Direktno iz živila	A <sub>19</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	-	<i>S. auricularis</i>	/
	Po obogatitvi	A <sub>20</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. warneri</i>	anaerobna rast, rast pri 15%NaCl, rast pri 15°C, rast pri prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8	Direktno iz živila	A <sub>25</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i>	anaerobna rast, izkoriščanje riboze
	Po obogatitvi	A <sub>26</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
29	Direktno iz živila	A <sub>76</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje saharoze
	Po obogatitvi	A <sub>77</sub>	Rumena – oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	+	+	+	/	<i>S. aureus</i>	/

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

### Nadaljevanje preglednica 6: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilkokokov iz vzorcev piščančjih jeter, piščančjih beder, piščančjega fileja ter piščančjih jeter in srca z osnovnimi testi

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA - za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
31	Direktno iz živila	A <sub>81</sub>	Belo-bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
		A <sub>82</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	/	nedoločljivo	/
	Po obogatitvi	A <sub>83</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	+	/	<i>S. capitis</i> ( <i>capitis</i> in <i>urolytius</i> ) <i>S. caprae</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> ( <i>cohnii</i> ), <i>S. equorum</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze, hemoliza

Pri izolaciji koagulaza pozitivnih stafilkokokov iz vzorcev piščančjih jeter, piščančjih beder, piščančjega fileja ter piščančjih jeter in srca smo le pri vzorcu številka 29 z izolacijo po obogatitvi določili bakterije vrste *S. aureus*. Pri vzorcu številka 5 smo pri izolaciji direktno iz živila izolirali bakterije vrste *S. auricularis*. Pri vseh ostalih vzorcih (vzorec številka 5 (po obogatitvi), vzorec številka 8 (izolacija direktno iz živila), vzorec številka 29 (izolacija direktno iz živila) in vzorec številka 31 (izolacija direktno iz živila in izolacija po obogatitvi) smo določili ostale bakterije iz rodu *Staphylococcus*. Za njih smo glede na literaturne podatke (FDA, 2001; Bergey`s manual..., 1994) določili dodatne potrditvene teste za ločevanje med posameznimi vrstami bakterij.



**Preglednica 7: Identifikacija bakterij koagualaza pozitivnih stafilkokov iz vzorcev sendvičev z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA-za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
10	Direktno iz živila	A <sub>29</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
	Po obogatitvi	A <sub>30</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
11	Direktno iz živila	A <sub>31</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	+	-	<i>S. cohnii</i> ( <i>cohnii</i> ) <i>S. equorum</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze, galaktoze, saharoze, riboze, rast pri 45°C
		A <sub>32</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	+	-	+	+	<i>S. delphini</i> , <i>S. intermedius</i>	rast pri 45°C
	Po obogatitvi	A <sub>33</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	+	/	<i>S. capitis</i> ( <i>capitis in urolyticus</i> ) <i>S. caprae</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> ( <i>cohnii</i> ), <i>S. equorum</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze, hemoliza
12	Direktno iz živila	A <sub>34</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	+	-	<i>S. cohnii</i> ( <i>cohnii</i> ) <i>S. equorum</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze, galaktoze, saharoze, riboze, rast pri 45°C
	Po obogatitvi	A <sub>35</sub>	Bež (belo)	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	/	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

### Nadaljevanje preglednica 7: Identifikacija bakterij koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev sendvičev z osnovnimi testi

Št. vzorca	Isolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA-za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
13	Direktno iz živila	A <sub>36</sub>	Oranžno – bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	+	-	<i>S. arlettae</i> <i>S. cohnii</i> ( <i>:urealyticus</i> ) <i>S. haemolyticus</i> <i>S. kloosi</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. xylosus</i>	anaerobna rast, izkoriščanje saharoze in riboze
	Po obogatitvi	A <sub>37</sub>	Bež – oranžno	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	+	/	<i>S. arlettae</i> , <i>S. capitis</i> ( <i>ureolyticus</i> ) <i>S. chromogenes</i> <i>S. choniI</i> ( <i>ureolyticus</i> ) <i>S. gallinarium</i> <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. kloosi</i> , <i>S. lentus</i> <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze in maltoze
14	Direktno iz živila	A <sub>38</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	+	-	<i>S. capitis</i> ( <i>capitis</i> ) <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje laktoze, maltoze, saharoze
	Po obogatitvi	A <sub>39</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	/	<i>S. auricularis</i> , <i>S. saccharolyticus</i> , <i>S. schleiferi</i> ( <i>schleiferi</i> )	ni ustreznega testa
15	Direktno iz živila	A <sub>40</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
	Po obogatitvi	A <sub>41</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	+	/	<i>S. capitis</i> ( <i>capitis</i> ) <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> ( <i>cohnii</i> ), <i>S. equorum</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. simulans</i>	anaerobna rast, izkoriščanje saharoze, maltoze, laktoze, fruktoze

Pri izolaciji koagulaza pozitivnih stafilokokov iz različnih vzorcev sendvičev nismo v nobenem vzorcu dokazali prisotnost bakterij vrste *S. aureus*. Pri vzorcih številka 10 in 15 (direktna izolacija iz živil) identifikacija bakterij vrste *Staphylococcus* ni bila mogoča. Pri vzorcih 10 in 15 (izolacija z obogatitvijo) ter 11, 12, 13, 14, pa smo z osnovnimi identifikacijskimi testi določili različne vrste bakterij. Za ločitev med temi vrstami smo določili dodatne teste s pomočjo ustreznih literaturnih podatkov (FDA, 2001; Bergey`s manual..., 1994).

**Preglednica 8 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev slaščic z osnovnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Katalaza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA- za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
16	Direktno iz živila	A <sub>42</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
	Po obogatitvi	A <sub>43</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
17	Direktno iz živila	A <sub>44</sub>	Bež – oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	-	-	-	+	nedoločljivo	/
	Po obogatitvi	A <sub>45</sub>	Bež – oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
18	Direktno iz živila	A <sub>46</sub>	Bež – oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i>	anaerobna rast, izkoriščanje riboze
	Po obogatitvi	A <sub>47</sub>	Rumeno – oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	-	<i>S. epidermidis</i> <i>S. auricularis</i>	anaerobna rast, rast pri 15%NaCl, rast pri 15°C, rast pri prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
19	Direktno iz živila	A <sub>48</sub>	Bež	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/
	Po obogatitvi	A <sub>49</sub>	Bež (belo)	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	nedoločljivo	/

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

### Nadaljevanje preglednica 8 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev slaščic z osnovnimi testi

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Barva kolonije	Morfološke lastnosti	Kataliza	Koagulaza	Glukoza	Manitol	DNA-za	Identifikacija	Predvideni dodatni testi
20	Direktno iz živila	A <sub>50</sub>	Oranžna	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	+	+	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. warneri</i>	anaerobna rast, rast pri 15% NaCl, rast pri 15°C, rast pri prisotnosti (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	Po obogatitvi	A <sub>51</sub>	Rumeno	Koki, grozd, Gr+	+	-	+	-	+	<i>S. arlettae</i> , <i>S. chonii</i> ( <i>ureolyticus</i> ) <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. kloosi</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosum</i>	anaerobna rast, izkoriščanje saharoze in riboze, hemoliza

Pri izolaciji bakterij rodu *Staphylococcus* iz različnih slaščic smo le v vzorcih številka 20 (višnjeva torta) in 18(kremna rezina) določili prisotnost različnih vrst stafilokokov. Glede na literaturne podatke (FDA, 2001; Bergy`s Manual..., 1994) smo določili dodatne teste za ločitev med posameznimi vrstami. Za ostale vzorce (16 (indijanček), 17 (ježek) in 19 (čokoladna torta)) ločitev med posameznimi vrstami stafilokokov ni bila možna.

#### 4.3 REZULTATI DODATNIH TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ VRSTE *S. aureus*

Po končani izolaciji in identifikaciji domnevnih vrst stafilokokov smo s pomočjo dodatnih testov določili prisotnost drugih vrst bakterij rodu *Staphylococcus*. Rezultati dodatnih testov so pokazali, da se v vzorcih razdetega mešanega mesa nahajajo predvsem bakterije vrste *S. epidermidis*, *S. sciuri* in *S. saprophytus* (preglednica 9).

**Preglednica 9: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev razdetega mesa**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev						Hemoliza	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija
			Anaerobno	15 % NaCl	15° C	45° C	Saharaza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza			
1	Direktno iz živila	A <sub>1</sub>	+	/	+	/	+	/	/	+	/	/	/	/	<i>S. saprophytus</i>
		A <sub>2</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	<i>S. epidermidis</i>
		A <sub>3</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	<i>S. epidermidis</i>
	Po obogatitvi	A <sub>4</sub>	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. sciuri</i>
6	Direktno iz živila	A <sub>21</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	<i>S. epidermidis</i>
21	Direktno iz živila	A <sub>52</sub>	+	/	/	/	-	+	+	/	/	/	/	/	<i>S. epidermidis</i>
		A <sub>53</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo
24	Direktno iz živila	A <sub>62</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo

Se nadaljuje



**Preglednica 10 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev svinjskih jeter z dodatnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev						Hemoliza	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija		
			Anaerobno	15 % NaCl	15 °C	45 °C	Saharoza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza					
7	Direktno iz živila	A <sub>23</sub>	+	/	/	/	+	+	+	/	/	/	/	/		<i>S. simulans</i>	
	Po obogatitvi	A <sub>24</sub>	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		<i>S. sciuri</i>
26	Direktno iz živila	A <sub>68</sub>	+	/	/	/	/	-	+	/	/	/	/	/	/		<i>S. chromogenes</i>

Z dodatnimi testi za identifikacijo (Bergey's manual..., 1994) smo v vzorcih svinjskih jeter (preglednica 10) določili bakterije vrste *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus sciuri* in *Staphylococcus chromogenes*.



**Preglednica 11: Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih kril z dodatnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev						Hemoliza	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija
			Anaerobno	15 % NaCl	15 °C	45 °C	Saharoza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza			
3	Direktno iz živila	A <sub>12</sub>	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. sciuri</i>
		A <sub>13</sub>	+	/	/	/	+	+	+	/	/	/	/	/	<i>S. simulans</i>
	Po obogatitvi	A <sub>14</sub>	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. sciuri</i>
9	Direktno iz živila	A <sub>27</sub>	+	/	/	/	+	+	-	/	/	-	/	/	<i>S. simulans</i>
22	Direktno iz živila	A <sub>55</sub>	+	/	/	/	+	-	+	/	/	/	/	/	nedoločljivo
		A <sub>56</sub>	+	/	/	/	+	-	+	/	/	/	/	/	nedoločljivo
25	Direktno iz živila	A <sub>64</sub>	+	/	/	/	+	-	+	/	/	/	/	/	nedoločljivo
28	Direktno iz živila	A <sub>73</sub>	+	/	/	/	/	+	/	/	/	/	-	/	<i>S. saprophytus</i>
		A <sub>74</sub>	+	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo

Pri vzorcih piščančjih kril s številko 3, 9, in 28 (preglednica 11) smo z dodatnimi potrditvenimi testi (Bergey's Manual..., 1994) določili bakterije vrste *S. sciuri*, *S. simulans* in *S. saprophytus*. Pri vzorcih številka 22 in 25 pa nam kljub dodatnim potrditvenim testom ni uspelo ločiti med posameznimi vrstami bakterij.

**Preglednica 12 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev govejih pljuč in jeter z dodatnim testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev						Hemoliza	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija	
			Anaerobno	15 % NaCl	15 °C	45 °C	Saharoza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza				
4	Direktno iz živila	A <sub>17</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/	nedoločljivo
30	Direktno iz živila	A <sub>79</sub>	+	/	/	/	/	+	+	/	/	/	/	/	/	<i>S. epidermidis</i>

Pri vzorcu številka 4 (goveja pljuča, preglednica 12) z dodatnimi potrditvenimi testi nismo ločili bakterij vrst *S. epidermidis* in *S. hominis*, medtem ko smo pri vzorcu številka 30 (goveja jetra) določili prisotnost bakterij vrste *S. epidermidis*.

**Preglednica 13 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev piščančjih beder, fileja, jeter in srca z dodatnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev							(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija
			Anaerobno	15 % NaCl	15°C	45°C	Saharoza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza	Hemoliza		
5	Po obogatitvi	A <sub>20</sub>	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. sciuri</i>
8	Direktno iz živila	A <sub>25</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	<i>S. epidermidis</i>
29	Direktno iz živila	A <sub>76</sub>	+	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo
31	Direktno iz živila	A <sub>81</sub>	+	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo
	Po obogatitvi	A <sub>83</sub>	+	/	/	/	/	-	+	/	/	/	+	/	nedoločljivo

Pri identifikaciji z dodatnimi potrditvenimi testi smo v vzorcu številka 5 (piščančja jetra, preglednica 13) dokazali bakterije vrste *S. sciuri*, v vzorcu številka 8 pa bakterije vrste *S. epidermidis*. V ostalih treh vzorcih nismo uspeli identificirati vrste bakterij z dodatnimi potrditvenimi testi.

**Preglednica 14 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev sendvičev z dodatnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev						Hemoliza	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija	
			Anaerobno	15 % NaCl	15 °C	45 °C	Saharaza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza				
10	Po obogatitvi	A <sub>30</sub>	+	+	+	/	/	+	/	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo
11	Direktno iz živila	A <sub>31</sub>	+	/	/	+	+	/	-	-	/	+	/	/	/	<i>S. cohnii (cohnii)</i>
		A <sub>32</sub>	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. intermedius</i>
	Po obogatitvi	A <sub>33</sub>	+	/	/	/	/	+	-	/	/	/	-	/	/	<i>S. capitis (ureolyticus)</i>
12	Direktno iz živila	A <sub>34</sub>	+	/	/	+	+	/	-	-	/	-	/	/	/	<i>S. cohnii (cohnii)</i>
	Po obogatitvi	A <sub>35</sub>	+	/	/	/	/	+	+	/	/	/	/	/	/	<i>S. epidermidis</i>
13	Direktno iz živila	A <sub>36</sub>	+	/	/	/	+	/	/	/	/	-	+	+	<i>S. saprophytus</i>	
14	Direktno iz živila	A <sub>38</sub>	+	/	/	/	+	+	+	/	/	/	/	/	/	<i>S. simulans</i>
	Po obogatitvi	A <sub>39</sub>	+	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	/	/	nedoločljivo
15	Po obogatitvi	A <sub>41</sub>	+	/	/	/	+	+	+	/	+	/	/	/	/	<i>S. saprophytus</i>

Pri vzorcih številka 10 (mega sendvič) in 14 (poli sendvič, izolacija po obogatitvi) tudi z dodatnimi identifikacijskimi testi (Bergey`s manual..., 1994) nismo mogli določiti vrste stafilokokov, ki je bila prisotna v naših vzorcih. Pri ostalih vzorcih pa smo dobili naslednje rezultate: V vzorcu številka 11 smo dokazali bakterije vrste *S. cohnii* (*cohnii*), *S. intermedius* in *S. capitis* (*ureolyticus*); v vzorcu številka 12 smo dokazali prisotnost bakterij vrste *S. cohnii* (*cohnii*) in *S. intermedius*; v vzorcu številka 13 in 15 so bile bakterije vrste *S. saprophytus* in v vzorcu 14 (izolacija direktno iz živil) smo določili bakterije vrste *S. simulans*.

**Preglednica 15 : Identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokokov iz vzorcev slaščic z dodatnimi testi**

Št. vzorca	Izolacija	Oznaka kolonije	Rast v različnih razmerah				Izkoriščanje sladkorjev						Hemoliza	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Identifikacija	
			Anaerobno	15 % NaCl	15 °C	45 °C	Saharoza	Maltoza	Laktoza	Galaktoza	Fruktoza	Riboza				
18	Direktno iz živila	A <sub>46</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	<i>S. epidermidis</i>
	Po obogatitvi	A <sub>47</sub>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. epidermidis</i>
20	Direktno iz živila	A <sub>50</sub>	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>S. sciuri</i>
	Po obogatitvi	A <sub>51</sub>	+	/	/	/	+	/	/	/	/	-	-	/	/	<i>S. saprophytus</i>

Z dodatnimi potrditvenimi testi (Bergey's manual..., 1994) smo v vzorcu 18 določili prisotnost bakterij vrste *S. epidermidis*, v vzorcu številka 20 pa prisotnost bakterij vrste *S. sciuri* in *S. saprophytus*.

#### 4.4 ANALIZA REZULTATOV

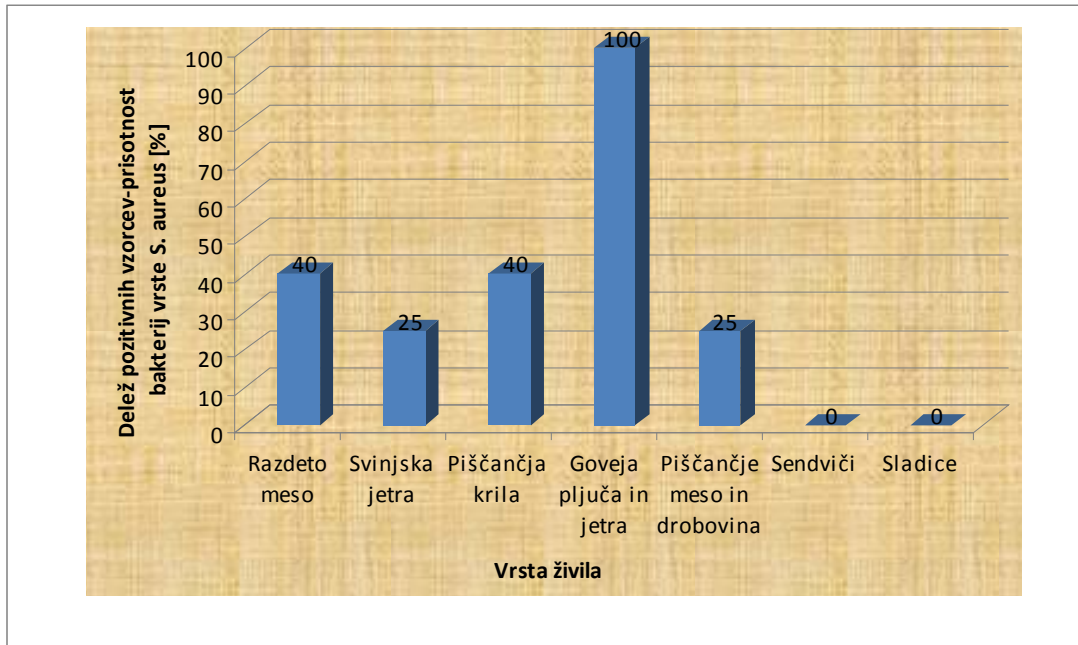
Rezultate izolacije in identifikacije koagulaza pozitivnih stafilokokov smo združili po posameznih skupinah živil in so prikazani v preglednici 16 in preglednici 17 ter na sliki 4.

**Preglednica 16 : Število in deleži izoliranih bakterij vrste *Staphylococcus aureus* v različnih vzorcih živil**

Skupina živil	Število vzorcev z bakterijami vrste <i>S. aureus</i> /skupno število vzorcev
Razdeto meso	2/5
Svinjska jetra	1/4
Piščančja krila	2/5
Goveja pljuča in jetra	2/2
Piščančje meso in drobovina	1/4
Sendviči	0/6
Sladice	0/5

Pri izolaciji bakterij vrste *S. aureus* v živilih smo dobili sledeče rezultate:

- V skupini petih vzorcev razdetega mesa smo v dveh vzorcih določili bakterije vrste *S. aureus*
- Med štirimi vzorci svinjskih jeter smo določili v enem vzorcu bakterije vrste *S. aureus*
- V skupini petih vzorcev piščančjih kril smo v dveh vzorcih določili bakterije vrste *S. aureus*
- V dveh vzorcih govejih pljuč in jeter smo določili v obeh bakterije vrste *S. aureus*
- V skupini štirih vzorcev živil, kjer so bila piščančja jetra, piščančji file, piščančje bedro in piščančja jetra ter srce smo v enem vzorcu določili prisotnost bakterij vrste *S. aureus*
- V skupini živil s šestimi vzorci sendvičev in v skupini s petimi vzorci slaščic pa ni bilo bakterij vrste *S. aureus*



Slika 4: Delež pozitivnih vzorcev živil glede na prisotnost bakterij vrste *S. aureus*

Rezultati analiz posameznih skupin živil so pokazali prisotnost bakterij vrste *S. aureus* le pri izolaciji po obogatitvi živila v slanem bujonu. Prisotnost bakterij vrste *S. aureus* smo dokazali pri vzorcih govejih pljuč, govejih in svinjskih jeter ter piščančjih krilih (preglednica 17).

Preglednica 17: Število vzorcev živil, v katerih smo bakterije vrste *S. aureus* določili direktno z izolacijo na gojišču BP in število vzorcev, v katerih smo bakterije vrste *S. aureus* določili po obogatitvi vzorca

Skupina živila	Število vzorcev	Št. bakterij vrste <i>S. aureus</i> v postopku izolacije brez obogatitve	Št. bakterij vrste <i>S. aureus</i> v postopku izolacije z obogatitvijo
Razdeto meso	5	0	2
Svinjska jetra	4	0	1
Piščančja krila	5	0	2
Goveja pljuča in jetra	2	0	2
Piščančje meso in drobovina	4	0	1
Sendviči	6	0	0
Sladice	5	0	0
SKUPAJ	31	0	8 (26 %)



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 POGOSTOST IZOLACIJE BAKTERIJ RODU *Staphylococcus* IZ ŽIVIL

Zastrupitev s stafilokoki je eden najpogostejših boleznih povzročenih z hrano, zaradi široke razširjenosti bakterij vrste *S. aureus* in njihove zmožnosti sinteze enega ali več stafilokoknih enterotoksinov (Normanno in sod., 2007a).

Z našimi rezultati klasične izolacije in identifikacije lahko potrdimo, da so bakterije rodu *Staphylococcus* v živilih zelo široko razširjene. Skupno število koagulaza pozitivnih stafilokokov v živilih je bilo v razponu od  $1 \times 10^2$  do  $6,86 \times 10^5$  cfu/g, kar še ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi, saj je glede na ugotovitve Al - Tarazija in sod. (2009) bilo ugotovljeno, da je potrebno minimalno  $5 \times 10^6$  cfu/g bakterij vrste *S. aureus* za produkcijo dovolj velike količine stafilokoknega enterotoksina, da povzroči zastrupitev z hrano.

Za naše analize smo uporabili 31 različnih vzorcev (med njimi so bili vzorci različnih vrst mesa, slaščic in sendvičev) in v njih dokazali s klasičnimi metodami izolacije in identifikacije prisotnost bakterij vrste *S. aureus* v osmih vzorcih po obogatitvi živila ali v 26 % živil. Ugotovili smo, da so bakterije vrste *S. aureus* prisotne predvsem v mesnih izdelkih kot so goveja jetra (100 %) in pljuča (100 %), piščančja krila (40 %), razdeto meso (40 %) ter svinjska jetra (25 %) in piščančji file (25 %). Tudi Normanno in sod. (2005) v svojih študijah navajajo, da so vzorci mletega mesa najbolj kontaminirani z bakterijami vrste *S. aureus* (31,6 %), sledijo jim vzorci svežega mesa (26,1 %) in zorjeni mesni izdelki (17,1 %). Število vzorcev živil pri našem eksperimentalnem delu je bilo sicer precej manjše od literaturnih podatkov, vendar pa so naši rezultati primerljivi.

V vseh drugih vzorcih so bile določene še ostale vrste bakterij rodu *Staphylococcus* in sicer:

- Bakterije vrste *S. auricularis* smo izolirali iz treh vzorcev (svinjska jetra, piščančja krila in goveja pljuča) z izolacijo direktno iz živil.
- Bakterije vrste *S. hominis* smo izolirali iz dveh vzorcev (svinjska jetra in piščančja krila) z izolacijo iz živil.
- Bakterije vrste *S. epidermidis* smo izolirali iz osmih vzorcev (od teh so bili štirje vzorci razdetega mešanega mesa, goveja jetra, piščančja bedra, sezamova štručka z tuninim namazom in kremna rezina).
- Bakterije vrste *S. saprophytus* smo določili v dveh vzorcih (razdeto mešano meso in piščančja krila).
- Bakterije vrste *S. sciuri* smo določili v šestih vzorcih (razdeto meso, svinjska jetra, piščančja krila, piščančja jetra, višnjeva torta).
- Bakterije vrste *S. simulans* smo izolirali iz štirih vzorcev (svinjska jetra, dva vzorca piščančjih kril in sendvič poli).
- Bakterije vrste *S. chromogenes* smo določili z direktno izolacijo le v enem vzorcu (svinjska jetra).

- Bakterije vrste *S. cohnii* (cohnii) smo izolirali v dveh vzorcih (študentski sendvič in sezamova štručka z tuninim namazom).
- Bakterije vrste *S. itnermedius* smo izolirali z direktno izolacijo iz enega vzorca (študentski sendvič).
- Bakterije vrste *S. capitis* (*ureolyticus*) smo izolirali iz enega vzorca (študentski sendvič).

Pri analizi koagulaza pozitivnih stafilokokov je bilo ugotovljeno, da so v največjem številu prisotne bakterije vrste *S. epidermidis* (v sedmih vzorcih), bakterije vrste *S. sciuri* (v šestih vzorcih). Sledijo jim bakterije vrste *S. simulans* (prisotne v štirih vzorcih) ostale vrste bakterij iz rodu *Staphylococcus* pa so prisotne le v enem ali dveh vzorcih ali pa ločitev med posameznimi vrstami bakterij ni bila možna. Tudi Rasooly in sod. (1997) so v svojih analizah ugotovili, da so bile bakterije vrste *S. epidermidis* od vseh koagulaza pozitivnih stafilokokov prisotne v največjem številu, ostale vrste (*S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. hycus*, *S. heamolyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*) pa so bile prisotne v enem ali dveh vzorcih.

## 5.2 METODOLOŠKI POMEN

Za izolacijo in identifikacijo bakterij vrste *S. aureus* smo uporabili gojišče BP. Težave, ki so se pri tem pojavile, so bile predvsem v ločevanju značilnih kolonij, ki so svojstvene za bakterije vrste *S. aureus* in značilnih kolonij, ki so svojstvene za ostale koagulaza pozitivne stafilokoke. Rezultati naših analiz so pokazali, da je določevanje bakterij vrste *S. aureus* na podlagi kolonij težavno in velikokrat nepravilno. Podobne težave omenjajo tudi De Buyser in sod. (2003) in Vicoso in sod. (2010). Kot alternativo za gojišče BP priporočajo agar z zajčjo plazmo (RPFA), saj poleg večje natančnosti za ločevanje med posameznimi kolonijami, omogoča tudi ločevanje med koagulaza pozitivnimi in koagulaza negativnimi stafilokoki.

## 5.3 SKLEPI

Z klasičnimi metodami izolacije in identifikacije smo v izbranih vzorcih določili bakterije vrste *S. aureus* in ostale bakterije iz rodu *Staphylococcus*. Prišli smo do sledečih ugotovitev:

- Skupno število stafilokokov v različnih vzorcih živil je bilo v razponu med  $1 \times 10^2$  do  $6,86 \times 10^5$  cfu/g, kar še ni zadostno število bakterij za tvorbo enterotoksina ob predpostavki, da so bakterije vrste *S. aureus* enterotoksigene;
- Bakterije vrste *S. aureus* so bile določene v 8 vzorcih živil (26 %) in to vedno po obogatitvi živila v slanem bujonu (goveja pljuča in jetra, svinjska jetra, razdeto meso, piščančja jetra, piščančji file in piščančja krila);
- V drugih vzorcih (74 %) so bile določene druge bakterije iz rodu *Staphylococcus* ali pa ločitev med posameznimi vrstami bakterij iz rodu *Staphylococcus* ni bila možna.

## 6 POVZETEK

Stafilokoki so eden glavnih povzročiteljev zastrupitev s hrano. Nevarnost za tako zastrupitev z bakterijami rodu *Staphylococcus* predstavljajo predvsem živila kot so svinjsko, piščančje in goveje meso, gotove jedi, kreme in sladoledi. Velik problem predstavljajo tudi proti meticilinu odporne bakterije vrste *S. aureus* (MRSA), saj postajajo odporne na čedalje večje število antibiotikov. Poleg stafilokokov veliko nevarnost predstavljajo tudi njihovi enterotoksini, saj so termostabilni in so tako lahko prisotni tudi v živilu po toplotni obdelavi in s tem lahko povzročijo bolezen pri ljudeh.

Namen našega dela je bil določiti bakterije vrste *Staphylococcus aureus* s klasičnimi metodami izolacije in identifikacije iz različnih živil. Vzorce za preiskave smo naključno izbrali v prometu. Za določanje skupnega števila koagulaza pozitivnih stafilokokov smo uporabili gojišče Baird–Parker, nato pa smo z različnimi identifikacijskimi testi (osnovni in dodatnimi) identificirali bakterije vrste *S. aureus* in druge vrste bakterij rodu *Staphylococcus*.

Ugotovili smo, da so bile bakterije vrste *S. aureus* prisotne v osmih vzorcih živil (26 %), med ostalimi stafilokoki pa so bile najbolj zastopane bakterije vrste *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. itnermedius*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, in *S. saprophytus*. Pri nekaterih vzorcih pa identifikacija vrstame bakterij ni bila možna.

## 7 VIRI

Al – Tarazi Y.H., Albetar A.H., Alaboudi A.R. 2009. Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International*, 42: 374 - 379

Atanassova V., Meindl A., Ring C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP – PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 105 - 113

Aycicek H., Cakiroglu S., Stevenson T.H. 2005. Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready – to – eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16: 531 - 534

Balaban N., Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 1 – 10

Bergey`s manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. 1994. Holt J.G. (ed.). Baltimore, Williams & Wilkins, : 544 - 551

Bergdoll M. S., Wong A.L. 1993. *Staphylococcus*: Properties and occurrence. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero C., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Oxford, Elsevier Science Ltd. : 5547 – 5561

De Buyser M.L., Lombard B., Schulten S.M., In`t Veld P.H., Scotter S.L., Rollier P., Lahellec C. 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999 – Enumeration of coagulase – positive *Staphylococci* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 185 - 194

Duraković S. 1991. *Prehrambena mikrobiologija*. Zagreb, Medicinska naklada: 233 – 234

Ertas N., Gonulalan Z., Yildirim Y., Kum E. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *International Journal of Food Microbiology*, 142 : 74 – 77

EFSA. 2010. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food – borne outbreaks in the European Union in 2008. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 1496 str.

<https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=gmail&attid=0.2&thid=12c7cb4437b1c448&mt=application/pdf&url=https://mail.google.com/mail/?ui%3D2%26ik%3D5272b9b818%26view%3Datt%26th%3D12c7cb4437b1c448%26attid%3D0.2%26disp%3Dattd%26zw&sig=AHIEtbQauZq66RfMw7-nkRsUIIIUVXrIjA&pli=1b> (26.11.2010)

EFSA. 2010. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food – borne outbreaks in the European Union in 2008: Slovenia – 2008. Report on trends and sources of zoonoses. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 387 str.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/slovenia08.pdf> (26.11.2010)

FDA. 2001. Bacteriological analytical manual : *Staphylococcus aureus*. Whashington, FDA - Food and Drug Administration: 5 str.  
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429> (09. 08.2010)

Food Doctors. 2008. The food safety file: *Staphylococcus aureus*. London, Food Doctors : 10 str.  
[http://www.fooddoctors.com/FSF/S\\_aureus.pdf](http://www.fooddoctors.com/FSF/S_aureus.pdf) (01.09.2010)

Houng B.T.M., Mahmud Z.H., Neogi B.S., Kassu A., Nhien N.V., Mohammad A., Yamato M., Dao H.T.A., Khan N.C. 2010. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready – to – eat foods. Food Control, 21: 166 - 177

Irlinger F. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase – negative *Staphylococci*. International Journal of Food Microbiology, 126: 302 - 310

ISO/DIS 6888 – 1 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive *staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species). 1997: 16 str.

ISO/DIS 6888 – 2 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive *staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species). 1997: 11 str.

Jasson V., Jacxsen L., Luning P., Rajkovic A., Uyttendalele M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiology, 27: 710 – 730

Jay J.M. 1992. Modern food microbiology. 4<sup>th</sup> ed. New York, Chapman & Hall: 455 - 473

Jeršek B. 2007. Praktikum mikrobiološke analize živil: Navodila in delovni zvezek. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21 - 22

Kapun – Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 197 - 197

Kerouaton A., Hennekinne J.A., Letertre C., Petit J., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. International Journal of Food Microbiology, 115: 369 - 375

Landolo J. J. 2000. *Staphylococcus*. V: Encyclopedia of microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Lederberg J. (ed.). San Diego, Academic Press, 4: 387 – 393

Lopes Pontes Iorio N., Barreto Rocha Ferreira R., Pinto Schuenck R., Lourenco Malvar K., Pereira Brilhante A., Fereira Nunes A.P., Callegario Reis Bastos C., Netto dos Santos K.R. 2007. Simplified and reliable scheme for species – level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2564 - 2669

Maršič K. 2009. Primerjava dveh selektivnih gojišč za dokazovanje izolatov *Staphylococcus aureus*, odpornih proti meticilinu v nadzornih kužninah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 67 str.

Martin S.E., Iandolo J.J. 1999. *Staphylococcus*: introduction. Detection by cultural and modern techniques. San Diego, Academic Press: 2062 - 2065

Morandi S., Brasca M., Lodi R., Cremonesi P., Castiglioni B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcal aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology*, 124: 66 – 72

Morot – Bizot S., Talon R., Leroy – Setrin S. 2003. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosum*, a species used in food fermentation. *Journal of Microbiological Methods*, 55: 279 – 286

Normanno G., Firiun A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu B., Decastelli B., Mioni R., Scuta S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Sias S., Parisi A., Quaglia N.C., Celano G. V. 2005. Coagulase – positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marked in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 73 - 79

Normanno G., La Salandra G., Quaglia N.C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E., Cellano G.V. 2007a. Occurrence characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115: str.: 290 – 296

Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellaccio A.L., Virgilio S., Celano G. V. 2007b. Methicilin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology* , 117: 219 - 222

Pesavento G., Ducci B., Comodo N., Lo Nostro A. 2007. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 18: 196 – 200

Pereira V., Lopes C., Castro A., Silva J., Gibbs P., Teixeira P. 2009. Characterization of enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isoates from various food in Portugal. *Food Microbiology*, 26: 278 - 282

Piette A., Verschraegen G. 2009. Role of coagulase – negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, 134: 45 – 54

Pollak P., Mehikić D., Klun N., Dekleva N. 2002. Smernice dobre higienske prakse HACCP za gostinstvo. Ljubljana, Gospodarska Zbornica Slovenije: 87 str.

Rosec J.P., Guiraud J.P., Dalet C., Richard N. 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 213 – 221

Sawant A.A., Gillespie B.E., Oliver S.P. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase – negative *Staphylococcus* isolated from bovine milk. *Veterinary Microbiology*, 134: 73 - 81

Seme K. 2002. Stafilokoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139 - 145

ZZV – Ce. 2010. Stafilokok aureus (*Staphylococcus aureus*) v živilih. Celje, ZZV – Ce - Zavod za zdravstveno varstvo Celje : 3 str.  
<http://www.zzv-ce.si/uploads/staphylococcus%20aureus.pdf> ( 01.09.2010)

Taponen S., Pyorala S. 2009. Coagulase – negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134: 29 - 36

Tranter H. S., Modi N. K., Hambleton. P. 1987 . New quality control methods: detecting bacterial toxins in food V: Natural toxicants in food: Progress and prospects. Watson D.H. (ed.). Chichester, Ellis Horwood Ltd.: 169 - 189

Oxoid: The manual. 1998. 8<sup>th</sup> ed. . Bridson E.Y. (ed.), Trieste, Oxoid: loč. pag. : 93 – 93

Vicosa G.N., Moraes P.M., Anderson K.Y., Nero L.A. 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird – Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express countsystem. *Food Microbiology*, 27: 447 – 452

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949 - 6958